

Die Rolle und Regulation von Integrin alpha10 bei physiologischen und pathophysiologischen Prozessen



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Naturwissenschaftlichen Fakultät III - Biologie und Vorklinische Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Ann-Kathrin Wenke
aus Preetz
November 2007

Promotionsgesuch eingereicht am: 09. 02. 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von: Frau Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Ralph Witzgall
	1. Gutachter:	Prof. Dr. Michael Thomm
	2. Gutachterin:	Prof. Dr. Anja Katrin Bosserhoff
	3. Prüfer:	Prof. Dr. Richard Warth

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Das maligne Melanom	1
1.1.	Die Melanomentwicklung	2
1.2.	Zell-Adhäsionsmoleküle des malignen Melanoms	3
1.3.	Transkriptionsfaktoren des malignen Melanoms	9
1.4.	Das Protein MIA (CD-RAP)	14
2.	Die Chondrogenese	15
2.1.	Zell-Adhäsionsmoleküle der Chondrozytendifferenzierung	16
2.2.	Die Rolle der extrazellulären Matrix- Moleküle	17
2.3.	Signalmoleküle in der Chondrozytendifferenzierung	19
2.4.	Transkriptionsfaktoren in der Chondrogenese	22
2.5.	Osteoarthritis	27
3.	Ziel der Arbeit	28
II.	Material und Methoden	29
1.	Material	29
1.1.	Zelllinien und primäre Zellen	29
1.2.	Organismen	29
1.3.	Oligonukleotide und Plasmide	29
1.4.	Bezugsquellen von Enzymen, Proteinen und Chemikalien	31
1.5.	Geräte	33
2.	Medien, Antibiotika und Puffer	34
2.1.	Medien zur Anzucht von E.coli und Zellkulturen	34
2.2.	Antibiotika	35
2.3.	Puffer und Lösungen	35
3.	Methoden	38
3.1.	Nukleinsäure-Analytik	38
3.2.	Proteinanalytik	43
3.3.	Zellkulturmethoden mit humanen Zelllinien	47
3.4.	Arbeiten mit <i>E. coli</i> und humanen mesenchymalen Stammzellen (HMSC)	50
3.5.	Statistik	51
III.	Ergebnisse	52

1.	Integrin alpha10 im malignen Melanom	52
1.1.	Die Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom ist erhöht.....	52
1.2.	Die Regulation der Transkription von <i>integrin alpha10</i> im malignen Melanom	56
1.3.	Die funktionelle Relevanz von Integrin alpha10 im malignen Melanom	62
2.	Integrin alpha10 in der Chondrogenese	66
2.1.	Die Regulation der Transkription von <i>integrin alpha10</i> in Chondrozyten	66
2.2.	Die Rolle von AP-2ε in der Differenzierung von Chondrozyten.....	72
2.3.	AP-2ε ist in Chondrozyten von Osteoarthritispatienten verstärkt exprimiert	73
2.4.	Identifizierung von weiteren Zielgenen, die durch AP-2ε reguliert werden	75
IV.	Diskussion.....	79
1.	Integrin alpha10 im malignen Melanom	79
1.1.	Die Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom.....	79
1.2.	Die Regulation der Transkription von <i>integrin alpha10</i> im malignen Melanom	80
1.3.	Die Funktion von Integrin alpha10 im malignen Melanom.....	81
2.	Integrin alpha10 in der Chondrogenese	83
2.1.	Die Regulation der Transkription von <i>integrin alpha10</i> in Chondrozyten	83
2.2.	Die Rolle von AP-2ε in der Differenzierung von Chondrozyten.....	84
2.3.	Die Expression von AP-2ε in OA-Chondrozyten	85
2.4.	Identifizierung von weiteren Zielgenen von AP-2ε in OA-Chondrozyten	87
V.	Zusammenfassung.....	92
VI.	Literaturverzeichnis	94
VII.	Anhang.....	115
1.	Abkürzungsverzeichnis	115
2.	Danksagung.....	117
3.	Erklärung.....	118

I. Einleitung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit Integrin alpha10 (ITGA10), einem Molekül mit Funktionen sowohl im malignen Melanom als auch im Knorpel. Um diesen beiden Expressionsorten gerecht zu werden, ist die folgende Einleitung in zwei Teile gegliedert. Der erste Teil befasst sich mit der Entwicklung des malignen Melanoms und mit den molekularen Grundlagen, die zu dessen Entstehung beitragen. Der zweite Teil der Einleitung behandelt die Chondrogenese und verschiedene Moleküle, die für die Differenzierung von Chondrozyten essentiell sind.

1. Das maligne Melanom

Das maligne Melanom, auch bekannt als „schwarzer Hautkrebs“, ist eine bösartige Tumorerkrankung, die durch Entartung der Pigment-bildenden Melanozyten entsteht. Maligne Melanome bilden sich überwiegend in der Haut, können aber auch im Auge, in der Hirnhaut oder in Schleimhäuten entstehen. Da die meisten Melanomzellen weiterhin Pigment bilden, fällt der Tumor durch ein dunkelbraun bis schwarzes Wachstum an der Oberfläche der Haut auf. Im Unterschied zum Basaliom (Basalzellkarzinom), einer benignen Hauterkrankung, bei der es sehr selten und erst im Spätstadium zur Metastasierung kommt, hat das maligne Melanom eine frühe Tendenz zur Metastasierung. Es wird deswegen zur Gruppe der hochmalignen Tumore gerechnet und ist für etwa 90 % der Mortalität an Hautkrebs verantwortlich.

Auf Grund ihrer Morphologie lassen sich klinisch und histopathologisch vier verschiedene Arten von Melanomen unterscheiden: das superfiziell spreitende Melanom (SSM), das noduläre Melanom (NM), das Lentigo-maligne Melanom (LMM) und das akrolentigenöse Melanom (ALM). Das superfiziell spreitende Melanom ist die am häufigsten auftretende Form des Melanoms und kommt als asymmetrische Hautveränderung mit unregelmäßiger Pigmentierung und Begrenzung vor. Das noduläre Melanom erscheint eher erhaben und ebenfalls mit pigmentierter und unregelmäßiger Erscheinung. Bei älteren Menschen tritt typischerweise eher das Lentigo-maligne Melanom an Hautarealen auf, die, wie die Wangen, andauernd dem Licht ausgesetzt sind. Das akrolentigenöse Melanom betrifft nur 5 % aller Patienten und bildet sich meist an den äußeren Extremitäten, wie an den Händen und Füßen. Neben diesen vier hauptsächlich auftretenden Formen des Melanoms gibt es noch weitere seltene Formen, wie das amelanotische, das desmoplastische und das polypoide Melanom, auf die hier nicht weiter eingegangen wird.

1.1. Die Melanomentwicklung

Die Entstehung eines Melanoms beginnt mit der Entartung von Melanozyten. Diese sind wie die Keratinozyten Zellen der Epidermis, der äußeren Hautschicht. Die Pigment-bildenden Melanozyten treten mit den Keratinozyten im Verhältnis 1:5 in Kontakt. Über Dendriten versorgen sie diese mit dem, in den Melanosomen enthaltenen Pigment Melanin, wodurch die DNA der Keratinozyten vor schädlichem UV-Licht geschützt ist. Die Keratinozyten hingegen kontrollieren die Proliferation der Melanozyten [1].

Die Entwicklung eines Melanoms ausgehend von einem entarteten Melanozyten bis hin zu einem metastasierenden Tumor lässt sich nach einem Modellsystem von Clark et al. in fünf verschiedene Stufen einteilen, wobei genetische und morphologische Veränderungen berücksichtigt werden [2; 3]. Zur ersten Stufe dieser Unterteilung wird der melanozytäre Nävus, eine frühe, hyperplastische Läsion von Melanozyten, gezählt, der nur selten entartet. Der dysplastische (atypische) Nävus allerdings, die zweite Stufe in der Melanomentwicklung, weist bereits strukturelle Veränderungen auf und wird als Vorläufer des Melanoms angesehen [1]. Durch das anormale Wachstum der Melanozyten dieser Nävi bilden sich Ansammlungen von Zellen, die bereits ihre typisch dendritischen Ausläufer verlieren. In der dritten Entwicklungsstufe des Melanoms befinden sich Zellen in der frühen radialen Wachstumsphase (RGP), wobei sie sich radial ausbreiten aber noch in der Epidermis verweilen. Erst in der nächsten Entwicklungsstufe, der vertikalen Wachstumsphase (VGP) dringen entartete Melanozyten durch die Basalmembran in die Dermis und das subkutane Gewebe vor und beginnen zu metastasieren. Der metastasierende Tumor bildet die letzte Stufe der Progression des Melanoms, bei der es sich sowohl über die Blutbahn als auch den Lymphweg im Körper ausbreitet. Allerdings verläuft die Entwicklung bis hin zu einem metastasierenden Melanom nicht immer in diesen fünf Stufen. Melanome können sich auch direkt aus Melanozyten entwickeln, ohne dass es zuvor zur Bildung von Nävi kommt.

Während der Entartung der Melanozyten zu Melanomzellen werden diese autonom und entziehen sich der Kontrolle durch die Keratinozyten der Epidermis. Diese stufenweise Entwicklung bis hin zu einem malignen Melanom bedingt verschiedene Veränderungen der Melanozyten. So müssen sich die Zellen zunächst der lokalen Wachstumskontrolle durch Zytokine und Apoptosesignale entziehen, damit der Tumor proliferieren kann. Außerdem verändern sie das Motilitäts- (Wanderungs-) und Adhäsionsverhalten, woran unter anderem auch Integrine beteiligt sind, so dass sie aus der Epidermis auswandern, die Basalmembran durchdringen und sich im Körper ausbreiten können.

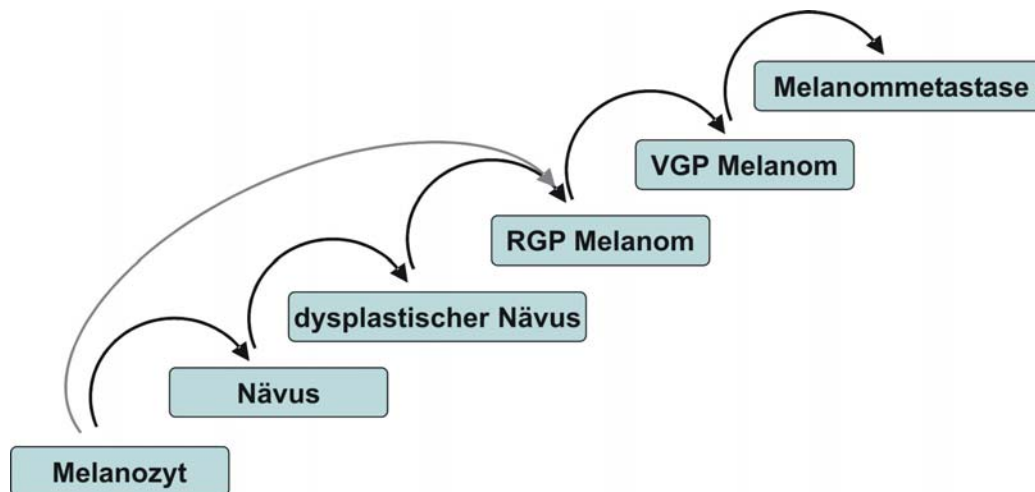


Abbildung 1: Modell der Tumorprogression bei Melanomen, verändert nach Clark et al., 1984. Dargestellt ist die stufenweise Entwicklung des Melanoms, vom Melanozyten bis zum metastasierenden Melanom. RGP = radial growth phase, VGP = vertical growth phase.

1.2. Zell-Adhäsionsmoleküle des malignen Melanoms

Die Abgrenzung von Organen und Geweben gegen die äußere Umgebung wird durch epitheliale Zellverbände gewährleistet. Die geordnete Struktur von Epithelien beruht zum einen auf sehr engen Kontaktstellen zwischen zwei Epithelzellen und zum anderen auf adhärenenten Verbindungen, die sich zwischen zwei Epithelzellen oder einer Epithelzelle und der extrazellulären Matrix ausbilden. Hemidesmosomen stellen dabei den Kontakt zwischen Aktinfilamenten in der Zelle und der spezifischen Oberfläche oder der Zellmembran einer anderen Zelle her. Die Epithelstruktur wird außerdem durch die Gewebs- und Organarchitektur multizellulärer Organismen festgelegt. Zelladhäsionsmoleküle sind zusätzlich an der Regeneration von Organen und dem generellen Zellverhalten beteiligt. Zudem regulieren sie die dynamischen Prozesse der Morphogenese im Verlauf der Embryonalentwicklung, was im zweiten Teil der Einleitung noch ausführlicher erörtert werden soll.

1.2.1. Integrine

Zu den Zelloberflächenproteinen zählen die Klassen der Integrine, Cadherine, die Immunglobulin-(Ig-) Superfamilie, Selektine und Mucine. Die Integrine sind wichtige Zelloberflächenrezeptoren, die den Kontakt der Extrazellulären Matrix (ECM) mit dem Aktin-

Zytoskelett vermitteln. Es sind heterodimere, transmembrane Glykoproteine, die sich aus einer alpha und einer beta Untereinheit zusammensetzen. Bisher sind in der Familie der Integrine 18 alpha und 8 beta Untereinheiten bekannt, die sich zu 25 verschiedenen Integrinrezeptoren zusammensetzen können. Diese werden auf Grund der Zusammensetzung ihrer Untereinheiten und der Ligandenspezifität in vier Unterfamilien eingeteilt. Die beta1-Unterfamilie stellt die größte Familie dar, denn mit der beta1 Untereinheit können 12 alpha Untereinheiten interagieren. Beta1 Untereinheiten stellen hauptsächlich den Kontakt der Zellen mit der ECM her. Die Integrine der zweiten Unterfamilie, der beta2/ beta7 Unterfamilie, sind Leukozyten-spezifische Rezeptoren. Sie vermitteln die Interaktion mit interzellulären Adhäsionsmolekülen (ICAMs), E-Cadherin und Fibrinogen. Die alphav Unterfamilie spielt eine wichtige Rolle bei der Organogenese von Säugetieren. Integrine dieser Familie werden von Epithelzellen, Endothelzellen, Osteoklasten und verschiedenen Tumorzellen exprimiert [4]. Die beta3 Unterfamilie steht im Zusammenhang mit histopathologischen Merkmalen wie der erhöhten Tumorigenität von entarteten Melanozyten und dient als Tumormarker. Die verstärkte Expression von Integrin alphav beta3 zum Beispiel ist maßgeblich an der Progression des malignen Melanoms und anderen Tumorarten beteiligt [5; 6].

Allen Integrinen ist ein homologer Aufbau aus einer alpha und einer beta Untereinheit gemein. Die alpha und die beta Untereinheit der Integrine bestehen aus einer langen extrazellulären Domäne, einer kurzen Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Domäne [7-9]. Die extrazelluläre Domäne der Integrin alpha Untereinheit enthält eine siebenfach homologe Wiederholung in der Sequenz, durch die bivalente Kationen wie Ca^{2+} und Mg^{2+} gebunden werden können. Dadurch erst wird die Ligandenbindung der Integrine vermittelt [10]. Die beta Untereinheit enthält nahe der Transmembrandomäne ein cysteinreiches Segment, welches in etwa 40 Aminosäuren umfasst. Die zytoplasmatische Domäne der Integrin alpha und beta Untereinheit ist wichtig für die Verbindung der ECM mit dem Aktin-Zytoskelett. Durch die Rekrutierung vieler Struktur- und Adapterproteine können von Integrinen so über eine Signalkaskade Signale in die Zelle übertragen werden [9; 10].

Die Dimerisierung der alpha und beta Untereinheit wird von den N-terminalen Enden vermittelt, die über Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verknüpft sind. Erst als Heterodimer können Integrine Liganden binden. Anders als andere Zelloberflächenrezeptoren ist die Liganden-Bindungsaffinität bei Integrinen vergleichsweise schwach. Allerdings ermöglicht diese schwache Bindungsaffinität den Zellen ein schnelles Anheften und Lösen

von der Umgebung, was für die Beweglichkeit der Zellen und für deren Fähigkeit zur Invasion ausschlaggebend ist [11].

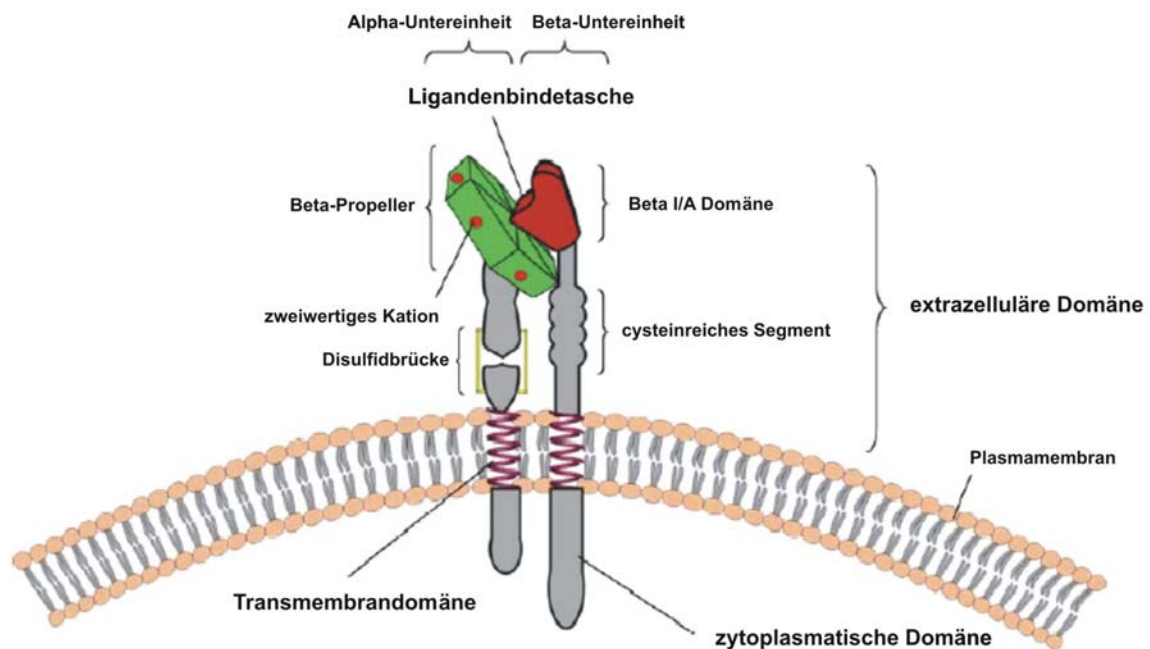


Abbildung 2: Schematische Darstellung der extrazellulären, transmembranen und zytoplasmatischen Domäne von heterodimeren Integrinen. Verändert nach Kuphal et al., 2005.

Nachdem Integrine ursprünglich als Zelladhäsionsmoleküle entdeckt wurden, die den Kontakt von Zellen untereinander und von Zellen mit der ECM vermitteln, konnte ihnen inzwischen auch eine wichtige Rolle als Überträger von Signalen für die Kommunikation von Zellen untereinander nachgewiesen werden [7; 10; 12; 13]. Dadurch erlangen sie Bedeutung für zahlreiche Prozesse in der Zelle wie Proliferation, Apoptose, Anoikis, Invasion und Metastasierung, Embryogenese, Tumorprogression oder Angiogenese [14-21].

Auf diese Weise sind Integrine auch an verschiedenen Signalwegen der Melanomentwicklung beteiligt [22; 23]. Sie haben eine Schlüsselfunktion für die Regulation der Migration der Tumorzellen und für das Überleben und die Proliferation des Tumors. Während der Entartung der Melanozyten zu Melanomzellen ändert sich das Expressionsmuster der Integrine. Die verstärkte Expression von verschiedenen Integrinen, wie Integrin $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_4\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$, geht einher mit einem zunehmenden metastatischen Phänotyp der Zellen

[24-26]. Der Kontakt der Melanomzellen mit der Umgebung, vermittelt durch Integrine, ermöglicht dem Tumor den Übergang vom stationären Wachstum hin zum migratorischen, invasiven Wachstum, also von der radialen Wachstumsphase (RGP) in die vertikale Wachstumsphase (VGP). Für diesen Prozess ist die verstärkte Expression von Integrin alpha v beta 3 ein spezifischer Marker [27-29].

Es soll nun näher auf das Integrin alpha10 beta1 eingegangen werden, da es für diese Arbeit von Bedeutung ist.

1.2.1.1. Integrin alpha10

Integrin alpha10, ein Kollagen Typ II-bindendes Integrin, wurde aus Chondrozyten isoliert und als neues Mitglied der beta1 Unterfamilie der Integrine charakterisiert [30]. Integrin alpha10 wird hauptsächlich im Knorpel, sowie im Muskelgewebe exprimiert [30; 31]. Im Rahmen dieser Arbeit konnte auch eine verstärkte Expression von Integrin alpha10 in Melanomzellen nachgewiesen werden.

Die alpha10 Untereinheit hat ein Molekulargewicht von 160 kDa und die übliche Struktur der alpha Untereinheiten, bestehend aus einer langen extrazellulären Domäne (1098 Aminosäuren), einer Transmembrandomäne (25 Aminosäuren) und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (22 Aminosäuren). Integrin alpha10 ist eng verwandt mit den anderen Kollagen bindenden Integrin Untereinheiten alpha1, alpha2 und alpha11, wobei die größte Identität zu alpha11 besteht. Es konnte gezeigt werden, dass Integrin alpha10 das dominierende Kollagen-bindende Integrin während der Knorpelentwicklung ist [32]. Eine Integrin alpha10 Knockout-Maus zeigt, dass Integrin alpha10 eine spezifische Rolle in der Morphogenese und Funktion der Wachstumsfuge hat [33]. Elektronenmikroskopische Aufnahmen der Wachstumsfuge von neugeborenen Mäusen zeigen eine erhöhte Zahl an apoptotischen Chondrozyten und eine reduzierte Dichte des Kollagenfibrillen Netzwerkes. Es sind allerdings nur vergleichsweise geringe Effekte, die sich durch den Verlust von Integrin alpha10 zeigen. Für die Knochenbildung ist Integrin alpha10 wichtig, aber nicht unbedingt notwendig und andere Kollagen-bindende Integrine wie alpha2 beta1 können diesen Verlust kompensieren [33].

1.2.2. Cadherine

Eine weitere Gruppe von Adhäsionsmolekülen, die für die Adhäsion zwischen Zellen sorgen, ist die Superfamilie der Cadherine. Diese Familie beinhaltet viele Mitglieder, die sich auf

Grund ihrer Struktur in sechs Unterfamilien gliedern lassen: (1) klassische Typ I Cadherine (E-, N-, P- und R-Cadherine), (2) klassische Typ II Cadherine (Cadherin-6 bis -12), (3) desmosomale Cadherine (Desmocollin, Desmoglein), (4) Cadherine mit einer eher kurzen zytoplasmatischen oder gar keiner Domäne (LI-, T-Cadherin), (5) Protocadherine und (6) Cadherin-verwandte Proteine, wie das Protein Flamingo, das Drosophila Tumorsuppressorgen *fat*, das Gen *dachsous* und das *ret*-proto-Onkogen [34; 35].

Die klassischen Cadherine sind Ca^{2+} -abhängige transmembrane Glykoproteine, die Zell-Zell-Adhäsion über ihre extrazelluläre Domäne vermitteln. Sie haben eine Transmembrandomäne gefolgt von einer hoch konservierten zytoplasmatischen Domäne, die die Bindung mit dem Aktinzytoskelett über Catenin Moleküle vermittelt [36].

In aggressiven Melanomen spielt das VE-Cadherin eine besondere Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass aggressive Melanome endothelassozierte Gene exprimieren und Endothel-ähnliche Funktionen ausüben können, um dreidimensionale Kanäle aus Laminin bilden zu können, die eine Versorgung des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sichern können [37]. Diesen Aufbau von gefäßartigen Strukturen ohne Beteiligung von Endothelzellen oder Fibroblasten nennt man „vasculogenic mimicry“.

Zwei weitere Moleküle der Cadherin-Familie, die für die Melanomentwicklung von großer Bedeutung sind, sind E- und N-Cadherin. Das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin ist für die „Kommunikation“ zwischen den Melanozyten und den Keratinozyten in der Epidermis der Haut besonders wichtig. Melanozyten haben ihren Ursprung im Neuroektoderm und wandern während der embryonalen Entwicklung von der Neuralleiste in die Epidermis der Haut ein. In dieser Umgebung wird dann der Kontakt zu den Keratinozyten über E-Cadherin vermittelt [38]. Dieses gilt als epithelialer Marker nicht entarteter Melanozyten und sorgt für die Aufrechterhaltung der geordneten Struktur des Gewebes. E-Cadherin wird bereits in der Embryonalentwicklung im Blastomer-Stadium exprimiert und ist im weiteren Entwicklungsverlauf in allen Epithelien nachweisbar. Studien belegen, dass die Expression von E-Cadherin für das Überleben essentiell ist, denn Embryonen von Knockout-Mäusen sterben im Stadium der Blastozyste ab [39; 40].

Zelladhäsionsmoleküle sind allerdings, außer an der Vermittlung der Zell-Zell-Interaktion während der Embryonalentwicklung, auch an der malignen Progression von Tumoren beteiligt. Erst durch den Verlust und die Fehlregulation von Zelladhäsionsmolekülen geht die geordnete Struktur eines Gewebeverbandes verloren, wodurch sich Zellen aus diesem lösen können [41]. Dieser Prozess ist als epitheliale mesenchymale Transition (EMT) bekannt. Für das maligne Melanom konnte gezeigt werden, dass E-Cadherin im Melanom, im Vergleich zu

Melanozyten und benignen Nävi, signifikant vermindert bzw. gar nicht mehr exprimiert wird [38; 42]. Durch den Verlust von E-Cadherin verlieren auch die Keratinozyten ihre Kontrolle über die Melanozyten, wodurch diese beginnen, unkontrolliert zu wachsen [38; 43; 44].

Der Verlust von E-Cadherin bei der Melanomentwicklung geht einher mit der Neuexpression von N-Cadherin, wodurch das Adhäsionsverhalten der Melanomzellen verändert wird. Sie lösen sich aus dem destabilisierten Zellverband mit den umgebenden Keratinozyten, werden mobiler und invasiv und lösen sich schließlich von dem Primärtumor. Dieses Umschalten der Cadherinexpression von E-Cadherin zu N-Cadherin führt zur Ausbildung von neuen Zell-Zell-Kontakten mit Fibroblasten des Stromas und Endothelzellen, die ebenfalls N-Cadherin an ihrer Oberfläche tragen [45]. Zusätzlich werden durch N-Cadherin antiapoptotische Signalkaskaden, wie Akt/PKB (Proteinkinase B) aktiviert, wodurch die Apoptose der Tumorzellen durch Inhibition des proapoptotischen Moleküls Bad verhindert wird [42]. Erst durch den Verlust der Expression von E-Cadherin und die beginnende Expression von N-Cadherin wird es den Tumorzellen ermöglicht, sich aus dem Gewebeverband zu lösen, wodurch es schließlich zur Metastasierung der Melanomzellen kommt.

1.2.3. Immunglobuline

Eine weitere Gruppe an Oberflächenmolekülen ist die Familie der Immunglobuline (Ig), zu der Mitglieder wie Mel-CAM/MUC18 (melanocytic cell adhesion molecule; CD146) und ICAM-1 (intercellular cell adhesion molecule-1) zählen. Sie ermöglichen, im Gegensatz zu Integrinen und Cadherinen, eine Kationen-unabhängige Zelladhäsion. Während der Melanomentstehung ist ihre Expression bei 80% der Melanome hochreguliert. Diese verstärkte Expression geht mit der Trennung von Melanozyten und Keratinozyten und dem Übergang von der radialen in die vertikale Wachstumsphase einher [46]. Durch membranständige Immunglobuline ist es Zellen möglich, sich zu Gruppen zusammenzulagern. Zusätzlich vermitteln diese aber auch durch Interaktion ihres zytoplasmatischen Teils mit Kinasen eine direkte Zellkommunikation und die Regulation von Wachstum und Differenzierung. Es ist bekannt, dass Mel-CAM/MUC18 auch als Ko-Rezeptor für die N-Cadherin abhängige Ausbildung von “gap junctions“ fungiert.

Wichtige Adhäsionsmoleküle, die an der Progression des malignen Melanoms beteiligt sind, sind in Abbildung 3 zusammengefasst.

Adhäsionsmoleküle während der Melanomprogression

verstärkte Expression:



Integrin alpha2 beta1
Integrin alpha4 beta1
Integrin alphaV beta3
Integrin alphallb beta3
Mel-CAM/MUC18
ICAM-1
ALCAM
N-Cadherin

verminderte Expression:



Integrin alphaV beta5
Integrin alpha6 beta1
VCAM-1
E-Cadherin

Abbildung 3: Schematische Darstellung der wichtigsten Adhäsionsmoleküle, die bei der Entstehung des Melanoms entweder verstärkt oder vermindert reguliert werden.

Neben Veränderungen im Adhäsionsverhalten müssen die Tumorzellen zusätzlich neue Eigenschaften entwickeln, um sich der Immunabwehr des Körpers entziehen zu können. Außerdem sind Defekte auf molekularer Ebene, wie in der Signaltransduktion, der Zellzykluskontrolle und auch die veränderte Regulation von Wachstumsfaktoren ausschlaggebend, die letztlich zur Entwicklung eines Melanoms führen. Die Expression der Gene, die diese Vorgänge beeinflussen und kontrollieren, wird durch zahlreiche Transkriptionsfaktoren reguliert. Die Analyse molekularer Mechanismen der Genregulation durch Transkriptionsfaktoren ist essentiell, weshalb im Folgenden näher auf die Transkriptionsfaktoren, die an der Progression des malignen Melanoms beteiligt sind, eingegangen werden soll.

1.3. Transkriptionsfaktoren des malignen Melanoms

1.3.1. Übersicht über die Transkriptionsfaktoren

Ein wesentlicher Transkriptionsfaktor, der an der Melanomentstehung beteiligt ist, ist **AP-1** (activation protein 1). Die AP-1 Familie besteht aus Jun (c-Jun, JunD, JunB) und Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB). Diese bilden Heterodimere und binden an die DNA-Sequenz 5'-TGA(C/G)TCA-3' im Promotorbereich ihrer Zielgene, um diese zu aktivieren [47]. Für das maligne Melanom konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression des Onkogens *fos* die Progression der Tumorzellen und dabei speziell die Invasivität fördert [48].

Der Transkriptionsfaktor **CREB1** (cAMP-responsive element binding protein1) spielt in der RGP Phase des malignen Melanoms eine wichtige Rolle. CREB1 gehört zu der ATF/CREB Familie, in der verschiedene Unterfamilien zusammengefasst sind: CREB/CREM, CRE-BP1 (=ATF2), ATF3, ATF4, ATF6 und B-ATF. Diese Transkriptionsfaktoren binden an die DNA-Sequenz 5'-TGANNTCA-3', die auch als CRE-Element (cAMP responsive element) bekannt ist [49]. Die Phosphorylierung von CREB ist entscheidend für die Aktivität und damit die Transkriptionsregulation. Zielgene dieser Transkriptionsfaktorfamilie sind unter anderem *fos*, *mel-CAM-MUC18* und *cyclinD1*. Es konnte gezeigt werden, dass Zellen mit einer verminderten CREB Aktivität auch eine verminderte MMP-2 Expression zeigen, was zu einer Reduktion der Invasivität der Zellen führt [50].

Die **CtBP** (C-terminal binding protein) Proteine dimerisieren und interagieren mit Histondeacetylasen oder mit anderen Transkriptionsfaktoren. Sie reprimieren die Transkription ihrer Zielgene durch Protein-Protein-Interaktion [51]. Es konnte gezeigt werden, dass CtBP im malignen Melanom nicht mehr exprimiert wird und dass dieser Verlust der CtBP Expression die Expression von MIA (melanoma inhibitory activity) über TCF-4 aktiviert [52].

Mitglieder der Familie der **ETS** Transkriptionsfaktoren, Ets-1, Ets-2, ERG, ELK1 und ELK2, haben eine sogenannte "ETS-Domäne" und aktivieren die Transkription durch Interaktion mit Purin-reichen Sequenzen (GGAA/T) [53]. Es ist bekannt, dass Ets-1 ein positiver Regulator von verschiedenen Genen ist, die an der Tumorprogression beteiligt sind, wie zum Beispiel MMP-1, MMP-3, MMP-9, uPA und auch beta3 Integrin. Im malignen Melanom ist Ets-1 hochreguliert [54; 55].

Eine weitere Gruppe von Transkriptionsfaktoren wird in **HMG-1/-2** (high mobility group proteins), HMG-14/-17 und HMG-I/-Y unterteilt. Für die DNA-Bindung ist eine wichtige Domäne, die "HMG-Box", verantwortlich. HMG-Proteine sind keine klassischen Transkriptionsfaktoren und binden überwiegend unspezifisch an die Linker-DNA zwischen zwei benachbarten Nukleosomen oder, wie HMG-14/-17, an den Nukleosomen-Kern. Dadurch wird die Ausbildung von ungewöhnlichen, dreidimensionalen Strukturen des Chromatins bewirkt. So ist HMG mit an der Transkriptionsregulation durch andere Transkriptionsfaktoren beteiligt, obwohl es nicht allein für die Chromatinstruktur verantwortlich ist. HMG-1 kann zusätzlich auch an spezifische Promotorregionen von Genen der Melanomzellen binden. Es bindet spezifisch an eine Region im Promotor von *MIA* (melanoma inhibitory activity) und aktiviert die Transkription, was zu einer erhöhten Melanominvasion führt [54; 56].

Wie schon die HMG-1/-2 Transkriptionsfaktoren besitzen auch die Transkriptionsfaktoren der **LEF/TCF** (lymphoid enhancer factor/T-cell-specific factor) Familie eine “HMG-Box“-Bindedomäne zur DNA-Erkennung und binden an die konservierte Konsensussequenz 5'-AGATCAAAGGG-3' [57]. Es sind vier Mitglieder dieser Familie bekannt: LEF-1, TCF-1, TCF-3 und TCF-4, die an Regulationsprozessen des Wnt Signalwegs beteiligt sind. Durch den Ko-Aktivator beta-Catenin wird die Transkription verschiedener Zielgene, wie *c-myc* und *cyclinD1*, aktiviert. Die Transkriptionsfaktoren der LEF/TCF Familie gelten generell als Tumorinduktoren, wobei im malignen Melanom die Aktivierung von LEF/TCF durch in den Zellkern transloziertes beta-Catenin noch diskutiert wird, da in vielen Melanomzelllinien beta-Catenin im Zellkern bisher nicht nachgewiesen werden konnte.

MITF (microphthalmia-associated transcription factor) erkennt als DNA-Bindemotiv die so genannte “M-Box“ mit der Sequenz 5'-AGTCATGTG-3'. Es sind bisher sechs Isoformen bekannt: MITF-A-D, MITF-H und MITF-M, wobei MITF-M spezifisch in Melanozyten und Melanomzellen exprimiert wird. In Melanozyten ist *MITF* ein essentielles Gen, denn es konnte gezeigt werden, dass Mäuse, bei denen die MITF Expression verhindert wurde, keine aus der Neuralleiste abstammenden Melanozyten mehr haben [58]. Aber auch für die Proteinexpression des malignen Melanoms gilt MITF als wichtiger Regulator. Zum Beispiel reguliert MITF die Expression von Bcl-2 und fördert somit das Überleben der Tumorzellen [59].

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der im malignen Melanom eine große Rolle spielt, ist **NFkappaB**. Es handelt sich dabei um einen homo- oder heterodimeren Komplex, der aus Proteinen der Rel-Familie besteht. Die Untereinheiten zeichnen sich durch die REL-Homologie-Domäne (RHD) aus, innerhalb derer sich die DNA-Bindestelle, das Kernlokalisierungssignal (NLS), welches von IkappaB Proteinen erkannt wird, sowie die Dimerisierungsregion und die Transkription modulierende Region befinden. Bisher sind fünf Mitglieder der NFkappaB/Rel-Familie bekannt: p65 (RelA), RelB, c-Rel, p100/p52 und p105/p50, wobei die häufigste Zusammensetzung von NFkappaB aus p50/p65 besteht [60]. NFkappaB reguliert Gene, die an verschiedenen Zellvorgängen beteiligt sind, wie zum Beispiel Immun- und Entzündungsreaktionen, Zellüberleben und Zellproliferation [61]. Im malignen Melanom ist NFkappaB konstitutiv aktiv, was auf eine gesteigerte Aktivität an IKK (IkappaB kinase komplex) in Melanomzelllinien zurückzuführen ist. Die konstitutive Aktivierung von IKK führt letztendlich dazu, dass die Heterodimere aus p65/ p50 vermehrt in den Zellkern translozieren und dort die Expression von Zielgenen regulieren können [62]. Allerdings konnten diese Ergebnisse nicht durch andere Arbeitsgruppen bestätigt werden. Es

konnte außerdem gezeigt werden, dass der Verlust von E-Cadherin im malignen Melanom zu einer Aktivierung von NFkappaB führt [63].

Der Transkriptionsfaktoren **SKI** und **Sno** werden im malignen Melanom im Vergleich zu Melanozyten verstärkt exprimiert und sind deswegen als Proto-Onkogene vermutlich an der Transformation der Melanozyten beteiligt [64; 65]. Sie können nicht direkt mit der DNA interagieren, sondern reprimieren über Smad3, ein Transkriptionsfaktor des TGF- β Signalwegs, TGF- β -spezifische Zielgene [66]. Die verstärkte Expression von SKI und Sno in Melanomzellen bewirkt, dass diese nicht mehr auf die TGF- β vermittelte Inhibition der Proliferation reagieren [67].

Durch Zink-Finger Motive im konservierten C-Terminus wird bei dem Zink-Finger Transkriptionsfaktor **snail** die Bindung an das "E-Box" Motiv 5'-CANNTG-3' der DNA vermittelt [68]. Es konnte gezeigt werden, dass die snail Proteine durch die direkte Promotorbindung und Repression von E-Cadherin zur Invasion von Tumorzellen beitragen [69]. Auch im malignen Melanom führt die verstärkte Expression von snail zu einer Repression des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin [44]. Während in der gesunden Haut das Wachstum von Melanozyten durch den Tumorsuppressor E-Cadherin von Keratinozyten kontrolliert wird, führt der Verlust von E-Cadherin im Melanom zur Progression des Tumors. Durch einen cDNA-Array konnten weitere snail-Zielgene im malignen Melanom identifiziert werden: *MMP-2*, *EMMPRIN*, *SPARC*, *TIMP-1*, *t-PA*, *rhoA* and *notch4* [70]. Sie alle haben eine regulatorische Funktion für den Übergang vom epithelialen zum mesenchymalen Gewebe (epithelial to mesenchymal transition = EMT) während der Tumورprogression, der ausschlaggebend für die Invasion der Tumorzellen ist.

Eine Funktion als Signalmoleküle und Transkriptionsaktivatoren des malignen Melanoms haben die **STAT** (signal transducers and activators of transcription) Proteine. Die Familie hat sieben Mitglieder: STAT1-STAT4, STAT5a, STAT5b und STAT6. Sie werden durch Phosphorylierung von Tyrosin aktiviert, gelangen in den Zellkern und binden dort an die Konsensussequenz 5'-TTCNNNGAA-3'. Resistenzen, die im malignen Melanom gegenüber Interleukin-6 (IL-6) und Interferon-alpha auftreten können, entstehend anscheinend durch einen Defekt im JAK-STAT Signalweg [71]. Weitere Studien belegen, dass STAT3 im Melanom konstitutiv aktiv ist, was zum Wachstum und zum Überleben der Melanomzellen beiträgt [72].

Von besonderer Bedeutung für diese Arbeit ist der Transkriptionsfaktor **AP-2**, weshalb im Folgenden ausführlich auf diese Transkriptionsfaktorfamilie eingegangen werden soll.

1.3.2. Der Transkriptionsfaktor AP-2

1.3.2.1. Die Funktion von AP-2

AP-2 (activating enhancer-binding protein 2) wurde als ein 52 kDa DNA-Bindeprotein identifiziert, das mit spezifischen Promotorelementen von SV40 (simian virus 40) und dem humanen Metallothionin IIa interagiert [73]. Es konnten bisher fünf Mitglieder der AP-2 Familie identifiziert werden: AP-2 α , AP-2 β , AP-2 γ , AP-2 δ und AP-2 ϵ [74-80]. Alle Isoformen haben eine hoch konservierte Helix-Turn-Helix Domäne zur Dimerisierung und DNA-Bindung in ihrem C-Terminus [81]. Der N-Terminus der AP-2 Proteine enthält Prolin- und Glutamin-reiche Domänen und ein PY-Motiv (XPPXY), welches für die Transkriptionsaktivierung wichtig ist [82]. Zur Regulation ihrer Zielgene binden die AP-2 Transkriptionsfaktoren an die palindromische Konsensussequenz 5'-GCCNNNGGC-3' [83]. Es konnte gezeigt werden, dass AP-2 Proteine eine Vielzahl von Genen regulieren, die in vielen physiologischen Prozessen während der Entwicklung, des Zellzyklus und der Differenzierung involviert sind. Dabei ist zu betonen, dass AP-2 sowohl als Aktivator als auch als Repressor die Transkription von Zielgenen regulieren kann. Dies ist wichtig für das Verständnis der Rolle von AP-2 im malignen Melanom, auf die später noch eingegangen wird.

Die Expression der AP-2 Familienmitglieder während der Mausentwicklung ist gut untersucht und zeigt, dass AP-2 in vielen Geweben exprimiert wird [79; 84-87], wie zum Beispiel in pre-migratorischen und migratorischen Neuralleistenzellen, während der Entwicklung der Extremitäten, des Zentralen Nervensystems, in Urogenitalgeweben und verschiedenen epithelialen Geweben, einschließlich der Haut. Der Knockout von verschiedenen AP-2 Isoformen resultiert in diversen spezifischen Defekten während der Entwicklung. Bei der AP-2 α Knockout-Maus zeigt sich der Phänotyp bereits an Tag 9,5 der Mausentwicklung durch ein offenes Neuralrohr [88; 89]. In späteren Entwicklungsstadien zeigt der mutierte Embryo zusätzlich Fehlentwicklungen an Kopf, Hals, Gesicht und Extremitäten. Im Gegensatz dazu zeigt die AP-2 β Knockout-Maus keine Abnormalitäten in diesen Geweben, stirbt aber nach der Geburt an einer polyzystischen Nierenerkrankung mit verstärkter Apoptose in den Nierenepithelien [90]. Auch Mäuse, bei denen gezielt AP-2 γ ausgeschaltet wurde, sterben während der Gastrulation direkt nach der Implantation, weshalb vermutet wird, dass AP-2 γ für die frühe Embryogenese essentiell ist [78; 91]. All diese Phänotypen von AP-2 Knockout-Mäusen sprechen dafür, dass die Mitglieder der AP-2-Familie besondere Bedeutung während der murinen Entwicklung haben. Darüber hinaus haben diese Proteine aber vermutlich noch weitere Funktionen, die am Knockout-Phänotyp nicht sichtbar sind.

Im humanen System konnte gezeigt werden, dass AP-2 Transkriptionsfaktoren das Tumorstadium und die Metastasierung im malignen Melanom und bei Brustkrebs kontrollieren [92-94].

1.3.2.2. Die Rolle von AP-2 im malignen Melanom

Die AP-2-Familie von Transkriptionsfaktoren ist maßgeblich an der Progression des malignen Melanoms beteiligt. Durch verschiedene Studien konnte gezeigt werden, dass das Fortschreiten der Melanomentwicklung hin zu einem metastasierenden Phänotyp mit dem Verlust der AP-2 Expression einher geht und dass die AP-2 Expression invers mit der Melanomprogression korreliert [95; 96]. AP-2 wirkt also im malignen Melanom als negativer Transkriptionsregulator. AP-2 reguliert viele Zielgene, die an der Progression des Melanoms beteiligt sind, wie zum Beispiel *E-Cadherin*, das an der Zelladhäsion beteiligt ist, oder *p21/WAF-1*, das den Zellzyklus reguliert. *HER2/neu*, beteiligt an Proliferation, *bcl-2* und *FAS/APO-1*, die in der Apoptose eine Rolle spielen, oder *IGF-R-1* und *VEGF*, wichtig für die Angiogenese, sind weitere Zielgene der Regulation durch AP-2 [97]. AP-2 α hat außerdem einen Einfluss auf die Expression des Tyrosin-Kinase Rezeptors c-KIT. Dieser ist im stark metastasierenden Melanom reprimiert, was auf den Verlust der AP-2 Expression in dieser Phase der Melanomentwicklung, beim Übergang von der vertikalen Wachstumsphase (VGP) in die radiale Wachstumsphase (RGP) zurückzuführen ist. Auch die Expression des Adhäsionsmoleküls MCAM/MUC18 korreliert direkt mit dem Potential, Metastasen zu bilden und wird durch die reduzierte Expression des Transkriptionsfaktors AP-2 reguliert [97-99]. Der Verlust der AP-2 α Expression in metastasierenden Melanomzellen führt auch zu einer verstärkten Expression des Thrombin-Rezeptor PAR-1 (protease-activated receptor-1), der wichtig für die Tumordinvasion ist und zur Metastasierung der Melanomzellen beiträgt [100-102]. Durch Microarraystudien konnten noch zahlreiche weitere Zielgene von AP-2 α identifiziert werden, unter anderem *integrin alpha5* und *alpha7* und *integrin beta3* und *beta5* [103].

1.4. Das Protein MIA (CD-RAP)

Das Protein MIA (melanoma inhibitory activity) wurde erstmals aus der humanen Melanomzelllinie HTZ-19 isoliert [104]. Ebenso konnte es als homologes Protein CD-RAP (cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein) in bovinen Chondrozyten identifiziert werden [105]. MIA gehört zu einer Genfamilie, als deren weitere Mitglieder OTOR [106-

108], TANGO [109] und MIA2 [110] beschrieben worden sind. OTOR wird spezifisch im Innenohrknorpel exprimiert, MIA2 ist leberspezifisch, und TANGO wird in fast allen Geweben mit Ausnahme von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert.

Das Protein MIA ist ein kleines Protein mit einem Molekulargewicht von 11 kDa. Während in Melanozyten keine Expression von MIA detektiert werden kann, ist die Expression im malignen Melanom um ein Vielfaches verstärkt [111; 112]. MIA wird von Melanomzellen sekretiert und bewirkt eine Abrundung der Melanomzellen [113]. In der Diagnostik wird MIA als ein Serummarker für die Detektion von Melanommetastasen verwendet [114-116].

Expressionsstudien haben außerdem eine Expression von CD-RAP (MIA) in Chondrozyten gezeigt. Es wird während der Chondrogenese von Chondroblasten und Chondrozyten exprimiert [105; 117], ist aber auch im adulten Knorpel vorhanden. Die Expression von CD-RAP im Knorpel korreliert eng mit der Expression anderer chondrozytärer Differenzierungsmarker, wie Aggrecan und Typ II Kollagen. Durch *in vitro* Analysen an primären Chondrozyten ist die Expression von CD-RAP gut untersucht. Nach Induktion der Differenzierung von Chondrozyten durch Stimulierung mit Dexamethason, TGF- β oder durch Aussäen der Zellen in bestimmten Zelldichten reexprimieren in der Zellkultur dedifferenzierte Chondrozyten CD-RAP [105; 118]. Wie diese Experimente zudem zeigen, wird die Expression von CD-RAP vermutlich durch transkriptionelle Regulation induziert. Es konnte die Promotoraktivierung von *CD-RAP* im Rahmen der Differenzierung gezeigt werden.

Im nun folgenden, zweiten Teil der Einleitung soll näher auf die Chondrogenese und die daran beteiligten Moleküle eingegangen werden.

2. Die Chondrogenese

Die meisten Elemente des Säugerskelettes werden durch die endochondrale Bildung von Knochen geformt. Dies ist ein komplexer Prozess, der mit der Migration von undifferenzierten mesenchymalen Zellen in Regionen beginnt, die dazu bestimmt sind, zu Knochen zu differenzieren. Diese Zellen kondensieren, wobei sie sich ansammeln und zusammenlagern ohne verstärkt zu proliferieren [119; 120]. Durch diesen Prozess werden die Knorpelanlagen der zukünftigen Skelettelemente gebildet, wobei die Position, Form und Anzahl der Skelettelemente bereits festgelegt sind. Die undifferenzierten Mesenchymzellen

produzieren nun eine ECM, die sich aus Typ I Kollagen (*Coll1a1*), Hyaluronsäure, Tenascin und Fibronectin zusammensetzt [121-124].

Die anschließende Differenzierung der mesenchymalen Zellen zu Chondrozyten (Chondrogenese) bewirkt eine Veränderung in der Zusammensetzung der ECM. Die Chondrozyten exprimieren knorpelspezifisches Typ II (*Col2a1*), Typ IX (*Col9a2*) und Typ XI (*Coll1a2*) Kollagen, Proteoglykan und Aggrecan, während Typ I Kollagen nicht mehr gebildet wird. Die zusammengelagerten Chondrozyten werden von ihrer ECM eingeschlossen und erhalten ihre charakteristische abgerundete Morphologie. Nach weiterer Differenzierung wird der Knorpel hypertroph, die Chondrozyten exprimieren verstärkt das Typ X Kollagen (*Coll10a1*) und reduzieren die Expression von Typ II Kollagen [125-131].

Durch die Einwanderung von Blutgefäßen aus dem Perichondrium vaskularisiert der Knorpel. Zusätzlich wandern Osteoblasten in den Knorpel ein, die beginnen, diesen durch mineralisierten Knochen zu ersetzen. Hypertrophe Chondrozyten gehen schließlich in Apoptose.

Dieser gesamte Prozess aus Chondrogenese, Hyperthrophie, Mineralisierung und Knochenbildung wird endochondrale Verknöcherung genannt. Die andere Art der Knochenbildung ist dagegen die intramembranöse Verknöcherung, bei der undifferenzierte Mesenchymzellen direkt zu Knochenzellen werden.

Im Folgenden soll näher auf die Kondensation und Differenzierung der Chondrozyten und die an diesem Prozess beteiligten Faktoren eingegangen werden.

2.1. Zell-Adhäsionsmoleküle der Chondrozytendifferenzierung

Die zelluläre Kondensation der Chondroblasten geht einher mit der vermehrten Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten, an der Zell-Adhäsionsmoleküle und “Gap junctions“ beteiligt sind, die die interzelluläre Kommunikation und den Transfer von Signalmolekülen zwischen den Zellen ermöglichen [132; 133]. Zwei Zelladhäsionsmoleküle, die in diesem Prozess eine wichtige Rolle spielen, sind N-Cadherin (neural cadherin) und N-CAM (neural cell adhesion molecule), welches zur Immunglobulin-Familie von Zelladhäsionsmolekülen (cell adhesion molecules = CAMs) gehört. Beide Moleküle werden während der Kondensation von mesenchymalen Zellen exprimiert, gehen jedoch im Laufe der Knorpeldifferenzierung wieder verloren [134].

N-Cadherin spielt in der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle, ist aber auch für Vorgänge in der Tumorprogression, wie zum Beispiel der Metastasierung des malignen

Melanoms, essentiell (siehe 1.2.2.). N-Cadherin wird während der Embryonalentwicklung in den prächondroblastischen Zellen der Extremitätenknospen exprimiert, was für eine Rolle während der zellulären Kondensation spricht [135]. Die Expression findet ihr Maximum während der mesenchymalen Zellkondensation und nimmt danach wieder ab, weshalb vermutet wird, dass die zelluläre Kondensation von N-Cadherin vermittelten Zell-Zell-Kontakten abhängig ist [135; 136]. Diese Theorie wird durch Studien von Oberlender und Tuan gestützt, in denen die N-Cadherin Funktion gehemmt wurde. Sie konnten zeigen, dass durch einen inhibitorischen monoklonalen Antikörper gegen N-Cadherin die zelluläre Kondensation und die Chondrogenese *in vitro* und *in vivo* signifikant gehemmt werden [137]. Neben N-Cadherin ist das Glykoprotein **N-CAM** ein weiteres Zelladhäsionsmolekül, das für die Chondrogenese von großer Bedeutung ist. Die Expression von N-CAM während der Entwicklung der Extremitäten setzt erst nach der Expression von N-Cadherin ein. Die Expression von N-CAM steigt im kondensierenden Mesenchym und die Zellen im Zentrum der Kondensation differenzieren. Im adulten Knorpel geht die N-CAM Expression wieder verloren, obwohl eine starke Expression im umgebenden Perichondrium noch nachzuweisen ist [138; 139]. Die funktionelle Rolle von N-CAM in der zellulären Kondensation und der Chondrogenese wurde in *in vitro* Studien analysiert. In Anwesenheit eines anti-N-CAM Antikörpers, der dessen Funktion hemmt, zeigten mesenchymale Zellen aus den Extremitätenknospen von Hühnern eine reduzierte Aggregation der Zellen mit einem reduzierten Maß an Knorpeldifferenzierung [138].

2.2. Die Rolle der extrazellulären Matrix- Moleküle

Ein weiterer wichtiger Faktor während der mesenchymalen Kondensation ist die Extrazelluläre Matrix (ECM), die während der Chondrogenese von den Zellen gebildet wird. Sie spielt nicht nur bei der Zelladhäsion eine Rolle, sondern übermittelt auch Signale von der Umgebung der Zelle zum Zytoskelett, Zytoplasma und zum Zellkern über komplexe Signaltransduktionskaskaden. **Integrine**, insbesondere Integrin beta1, spielen dabei im Verlauf der Chondrogenese eine wichtige Rolle, weil sie den Kontakt der Chondrozyten mit der extrazellulären Matrix über Kollagen Typ I und Typ II und Fibronektin vermitteln [140]. Der Expressionswechsel von Typ I Kollagen zu Typ II Kollagen, der stattfindet, wenn die mesenchymalen Zellen beginnen zu kondensieren und zu Chondrozyten zu differenzieren, geht einher mit einer Veränderung der Expression von Integrin alpha1 beta1 hin zu Integrin alpha3 beta1, was auf die beginnende Chondrogenese hindeutet und die zelluläre

Differenzierung bewirkt [141]. Im weiteren Verlauf der Differenzierung ist Integrin alpha5 beta1 das vorherrschende Integrin in Chondrozyten [142]. *In vitro* Studien, bei denen mesenchymale Zellen aus Extremitätenknospen von 12 Tage alten Mäusen mit inhibitorischen Antikörpern gegen Integrin beta1, Integrin alpha1 oder Integrin alpha5 behandelt wurden, haben deutlich gezeigt, dass vor allem Integrin beta1 in der frühen Phase der Knorpeldifferenzierung eine entscheidende Rolle spielt [143]. Die Behandlung der Zellen mit einem anti-beta1-Antikörper zu Beginn der Kultivierung der Zellen (Tag 1-3) inhibiert die Differenzierung zu Chondroblasten und die Bildung der Knorpelmatrix, wohingegen die Behandlung mit einem anti-alpha1- oder anti-alpha5-Antikörper die Differenzierung nicht inhibiert. Allerdings ist zu bedenken, dass durch Verwendung eines inhibitorischen Antikörpers gegen Integrin beta1 auch andere Integrine mit inhibiert werden, da Integrin beta1 mit vielen alpha-Untereinheiten Bindungen eingehen kann. Das Integrin alpha5 beta1 ist der Rezeptor für das ECM-Protein Fibronectin, über das der Kontakt der ECM mit den Chondrozyten vermittelt wird.

Fibronectin, das im undifferenzierten Knorpel verstärkt exprimiert wird, fördert das Zellattachement und ist somit für die mesenchymale Kondensation sehr wichtig. Es ist als dimeres Glykoprotein in der ECM vieler Gewebe zu finden und spielt eine wichtige Rolle bei Zell-Matrix- und Matrix-Matrix-Interaktionen, bei der Zellmigration und Differenzierung. Interessanterweise verändert sich die Struktur von Fibronectin während der Chondrogenese. Mesenchymales Fibronectin enthält die beiden Exone EIIIA und EIIIB (B^+A^+), wohingegen bei Fibronectin, das im Knorpel gebildet wird, das Exon EIIIA durch alternatives splicing fehlt (B^+A^-). Bei Fibronectin im Plasma sind sowohl Exon EIIIA als auch Exon EIIIB durch splicing entfernt (B^-A^-) [144-147]. Es wird vermutet, dass die Expression von alternativen Formen von Fibronectin zur Veränderung vom Mesenchym zu Chondroblasten beiträgt [148]. Dies geschieht vermutlich über Signalkaskaden, vermittelt durch den Fibronectinrezeptor Integrin alpha5 beta1 und die damit assoziierte Kinase ILK (integrin linked kinase), wobei der Wnt-Signalweg beteiligt ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von ILK den Einbau von Fibronectin in die Matrix von Epithelzellen fördert [149]. Zusätzlich kommt es zu einer verminderten Expression von E-Cadherin und der Translokation von β -Catenin, einem Cadherin-assoziierten Protein, das im Wnt-Signalweg beteiligt ist, in den Nukleus. Im Zellkern bindet β -Catenin an LEF-1 (lymphoid enhancing factor 1), ein Transkriptionsaktivator im Wnt-Signalweg und wirkt als Ko-Aktivator, so dass es zur Transkription von Zielgenen kommt. Die Überexpression von ILK führt ebenfalls zu einer verstärkten Expression von LEF-1 und

bewirkt ein schnelles Loslösen der Zellen von der ECM [150]. Schließlich haben weitere Analysen ergeben, dass ILK die Aktivierung von GSK-3 β (glycogen synthase kinase-3 β), einem weiteren Schlüsselmolekül im Wnt-Signalweg, das β -Catenin phosphoryliert, verhindert [151]. Da der Wnt-Signalweg und die daran beteiligten Moleküle in der Chondrogenese einen großen Stellenwert haben, soll dieser und auch die Rolle von weiteren Signalmolekülen, die für die Differenzierung von Chondrozyten wichtig sind, im Folgenden näher charakterisiert werden.

2.3. Signalmoleküle in der Chondrozytendifferenzierung

Die **Wnt** (*Drosophila* wingless: Wg)-Familie besteht aus 19 Mitgliedern. Diese cysteinreichen, sekretierten Glykoproteine sind an unterschiedlichen Determinierungs- und Entwicklungsvorgängen beteiligt [152-154]. Wnt Signale werden durch die Interaktion mit dem Membranrezeptor frizzled (*Drosophila* frizzled: DFz2) vermittelt, was schließlich zur Inaktivierung der GSK-3 β Serin/Threonin Kinase und somit zur Ansammlung von β -Catenin im Zytoplasma führt.

Ist der Wnt-Signalweg nicht aktiv, wird ungebundenes β -Catenin in der Zelle durch den Axin/APC (adenomatous polyposis coli)-Komplex gebunden und durch eine Serin/Threonin Kinase (CKI) Kinase und GSK-3 β phosphoryliert [155]. Die Phosphorylierung dient als Signal zur Ubiquitinierung durch einen TrCP (beta-transducin repeat- containing proteins)-Komplex und anschließenden Proteasomenabbau [156; 157]. Bei Aktivierung des Wnt-Signalwegs und somit einer inaktiven GSK-3 β akkumuliert β -Catenin im Zytoplasma und kann über die Bindung an Nukleoporene in den Zellkern translozieren [158], wo es mit LEF-1/TCF (T-cell factor) zu einem aktiven Transkriptionskomplex interagiert [159; 160]. Durch Wnt-Signale wird das zytoplasmatische und das im Kern lokalisierte β -Catenin stabilisiert, indem APC und die GSK-3 β β -Catenin nicht mehr dem Proteasomenkomplex zugänglich machen können.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass LEF-1/TCF- β -Catenin einen positiven regulatorischen Effekt auf viele Promotoren ausüben, ist es nicht ausgeschlossen, dass LEF-1 und β -Catenin im Komplex auch als Inhibitoren auf die Transkription von Genen wirken können. Wenn β -Catenin im Zellkern nur in geringer Konzentration vorhanden ist, wird TCF von CBP (cyclic AMP response element binding protein), einem Ko-Aktivator, gebunden und azetyliert, was zu einer verminderten Affinität für β -Catenin und der Transkriptionshemmung von Promotoren mit einer TCF Bindestelle führt [161].

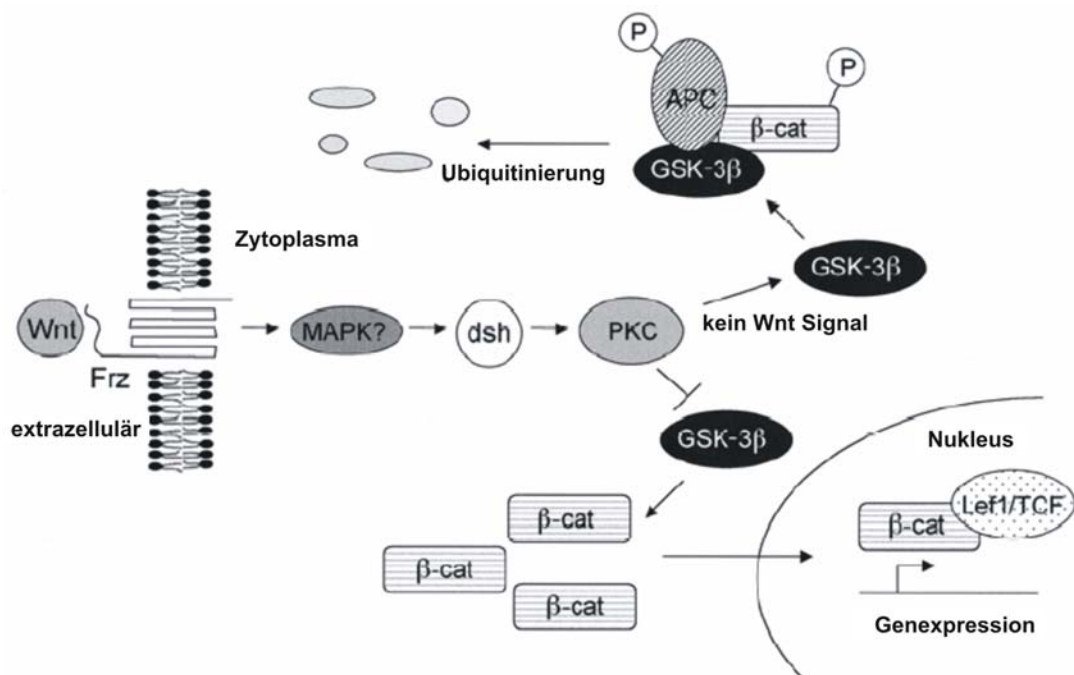


Abbildung 4: Schematische Übersichtsdarstellung des Wnt-Signalwegs in Chondrozyten. Verändert nach DeLise et al., 2000.

Im Verlauf der Chondrogenese ist die Wnt-Signaltransduktion von funktioneller Bedeutung, was in verschiedenen Analysen gezeigt werden konnte. In Kulturen von mesenchymalen Zellen aus den Extremitäten von Hühnerembryonen, die mit BMP-2 (bone morphogenic protein 2) behandelt wurde, was die Chondrogenese verstärkt, wurde die Expression von Wnt-3, Wnt-5A und Wnt-7A nachgewiesen, wobei die Expression von Wnt-7A im Verlauf der Chondrogenese abnimmt [162]. In Kulturen von murinen multipotenten mesenchymalen C3H10T1/2 Zellen, die in hoher Dichte gehalten werden, um die Zell-Zell-Interaktion und die zelluläre Kondensation zu fördern, werden nach BMP-2-Stimulierung Wnt-3 verstärkt und Wnt-7A vermindert exprimiert [163]. *In vitro* Analysen haben gezeigt, dass Wnt-7A die Chondrogenese inhibiert [164; 165]. Anders als Wnt-7A jedoch wirkt das Wnt-Familienmitglied Wnt-3A. Eine Überexpression von Wnt-3A führt zu einer Verstärkung der BMP-2 vermittelten Chondrogenese [166]. Zusätzlich bewirkt diese verstärkte Expression eine Verminderung von N-Cadherin und GSK-3β, sowie die Steigerung von β-Catenin und LEF-1 im Zellkern und damit eine Aktivierung des Wnt-Signalwegs.

Auch Mitglieder der **TGF-β** (transforming growth factor β) Superfamilie von Signalmolekülen, TGF-βs und BMP-2 bis BMP-8, spielen eine wichtige Rolle in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie Wachstum, Differenzierung, Apoptose,

Osteogenese und Chondrogenese [167]. Durch viele *in vitro* Studien konnte gezeigt werden, dass BMP-2 und TGF- β die Chondrogenese und damit assoziierte Expression von Kollagen Typ II und auch die Osteogenese fördern [168; 169]. Andererseits gibt es aber auch Untersuchungen, die besagen, dass TGF- β die Reifung der Chondrozyten und die Expression von Kollagen Typ X in der Wachstumsfuge inhibiert [170; 171].

Die Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor T β RII (TGF- β Rezeptor Typ II) führt zur Phosphorylierung und Aktivierung des Typ I Rezeptors (T β RI). Die aktivierte T β RI Kinase phosphoryliert Smad2 oder -3, was die Interaktion mit dem “common” Smad, Smad4, bewirkt, bevor sie in den Zellkern translozieren. Dort aktivieren oder inhibieren die heterodimeren Smad-Moleküle in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren durch direkte Bindung an die DNA die Transkription von Zielgenen [172].

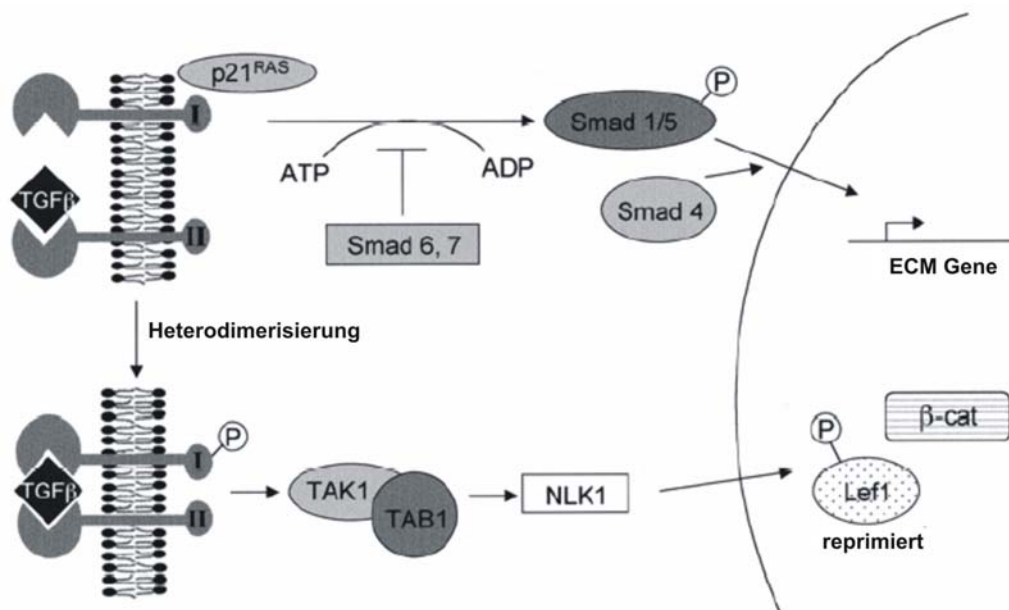


Abbildung 5: Schematische Übersichtsdarstellung des TGF β -Signalwegs in Chondrozyten. Verändert nach DeLise et al., 2000.

In ähnlicher Weise verläuft die BMP-vermittelte Signaltransduktion über die Aktivierung der Kinase ihrer Typ I Rezeptoren, BMPRIa und BMPRIb, in Verbindung mit BMPRII. In

diesem Fall führt die Rezeptoraktivierung zur Phosphorylierung von Rezeptor-Smads, Smad1, -5 und -8, bevor es zur Interaktion mit Smad4 kommt [173].

TGF- β und BMP können auch Signale über den MAP Kinase Signalweg vermitteln, indem sie die MAPK Kinase Kinase TAK1 (TGF- β activated kinase) durch deren endogenen Aktivator TAB1 (TAK1-binding protein) aktivieren. Es konnte gezeigt werden, dass TAK1 über NLK (NEMO-like kinase) als negativer Regulator des Wnt-Signalwegs wirken kann, indem es über direkte Phosphorylierung von LEF-1 die Bindung von β -Catenin an LEF-1 inhibiert [174].

Neben den hier beschriebenen Signalmolekülen gibt es noch zahlreiche weitere, die an der Chondrogenese beteiligt sind, auf die aber nicht näher eingegangen werden soll.

2.4. Transkriptionsfaktoren in der Chondrogenese

Eine weitere wichtige Molekülgruppe, ohne die eine Differenzierung der Chondrozyten nicht möglich wäre, sind die Transkriptionsfaktoren. Eine Schlüsselrolle spielt dabei die Familie der Sox Gene, die im Folgenden nun näher beschrieben werden soll.

Die **Sox Gene** umfassen eine große Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die an vielen Entwicklungsprozessen wie der Geschlechtsbestimmung, der neuralen Induktion und auch der Skelettentwicklung beteiligt sind. Die Sox Gene gehören zur HMG-Box Superfamilie (Sry-type high mobility group (HMG) box) von Transkriptionsfaktoren. Die Mitglieder der Sox Superfamilie haben eine Aminosäureidentität von mindestens 50 % zur HMG-Box DNA-Bindedomäne von SRY (sex determining factor). Die Transkriptionsfaktoren der Sox-Familie binden an die Konsensussequenz (A/T)(A/T)CAA(A/T)G in der kleinen Furche der DNA [175].

In der Chondrogenese hat der Transkriptionsfaktor Sox9 eine essentielle Funktion. Sox9 bindet an HMG-Box Bindestellen in der DNA. In Mausembryonen wird Sox9 in allen chondrogenen Vorläuferzellen und Chondrozyten exprimiert, während die Expression in hypertrophen Chondrozyten wieder stark vermindert ist [176-178]. Die physiologische Rolle von Sox9 in der Chondrogenese wurde erstmals bei der Campomelischen Dysplasie (CD) entdeckt. Diese genetische Krankheit wird durch eine heterozygote inaktivierende Mutation in und um das *sox9* Gen verursacht. Patienten mit CD haben Abnormalitäten in allen Strukturen, die sich aus dem Knorpel entwickeln, was sich durch gekrümmte Knochen und Schädel- und Gesichtsdefekte äußert [179]. Der Effekt von einem kompletten Sox9-Verlust in der Chondrogenese wurde in Maus-Chimären, denen homozygote embryonische Sox9^{-/-} Stammzellen in Wildtyp Blastozysten gespritzt wurden, untersucht, denn eine Sox9

Knockout-Maus ist nicht lebensfähig [180]. Die Sox9^{-/-} Zellen waren von der mesenchymalen Kondensation der Chondrozyten ausgeschlossen und haben die Chondrozytenmarker Col2a1, Col9a2, Col11a2 und Aggrecan nicht exprimiert. In einer anderen Studie ist die Inaktivierung des *sox9* Gens in den Extremitätenknospen untersucht worden. Dabei wurde vor der chondrogenen mesenchymalen Kondensation ein Cre Rekombinase/loxP Rekombinationssystem verwendet und es kam zu einem kompletten Verlust der mesenchymalen Kondensation und der Expression von Chondrozytenmarkergenen [181]. Diese Studien verdeutlichen die essentielle Rolle von Sox9 bei den anfänglichen Schritten der Chondrogenese, genauer der mesenchymalen Kondensation. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Sox9 auch im weiteren Verlauf unverzichtbar ist. Der Transkriptionsfaktor reguliert die Differenzierungsmarker Kollagen Typ II, der sehr ähnliche Expressionsmuster zeigt wie Sox9 [182], und auch CD-RAP (MIA) [183]. Durch Inhibierung von Sox9 mit dem Cre Rekombinase/loxP Rekombinationssystem nach der mesenchymalen Kondensation kommt es zu schwerwiegenden Chondrodysplasien, einer Reduktion von Knorpel-spezifischen Matrixmolekülen und dem Fehlen von proliferierenden Chondrozyten [181]. Allerdings sind die Expression und die Funktion von Sox9 nicht auf die Chondrogenese allein beschränkt [179], was vermuten lässt, dass andere Transkriptionsfaktoren mit Sox9 kooperieren, um spezifisch die Markergene der Chondrozytendifferenzierung zu aktivieren. Andere Sox-Proteine können mit Transkriptionsfaktoren von verschiedenen Familien interagieren, so dass diese Interaktionen die Spezifität der von diesen Sox-Proteinen in der Aktivierung von Zielgenen erhöht [184]. Durch eine weitere Studie konnte diese Vermutung gestützt werden. Furumatsu und Kollegen konnten zeigen, dass der TGF- β Signalweg mit der Sox9 Induktion der Kollagen Typ II Expression in Zusammenhang steht [185]. Der Heterodimere Smad2/3-Komplex interagiert mit Sox9 am *col2a1* Promotor und vermittelt den Kontakt von Sox9 mit dem Ko-Aktivator CBP (cAMP-response element-binding protein) und dessen Paralog p300, die zur Aktivierung der Transkription notwendig sind, und ist so maßgeblich an der Differenzierung der Chondrozyten beteiligt.

Sox5 und Sox6, die eine hohe Sequenzidentität untereinander aufweisen, gehören zu einer anderen Untergruppe der Sox-Proteine und haben, außer der HMG-Box, keine Sequenzhomologien zu Sox9. Sie formen Homo- und Heterodimere miteinander, haben jedoch keine Domäne zur Transkriptionsaktivierung wie Sox9. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Sox5 und Sox6 mit Sox9 in Kooperation die Genexpression von *col2a1* aktivieren, indem sie mit Sox9 interagieren [186]. Die physiologische Rolle von Sox5 und Sox6 ist im Mausmodell gut untersucht worden. Obwohl homozygote Sox5 (Sox5^{-/-}) und

Sox6 (Sox6^{-/-}) Knockout-Mäuse nur relativ schwache Abnormalitäten des Skelettes aufweisen, sterben Mäuse mit einer Doppelmutation Sox5^{-/-}Sox6^{-/-} im Uterus mit nicht vorhandenem Knorpel [187]. In diesen Mäusen findet zwar die mesenchymale Kondensation statt, allerdings kommt es nicht zu einer Differenzierung der Chondrozyten. Die Expression von chondrozytären Markern ist reduziert, die Menge an Sox9 mRNA ist aber mit der im Wildtyp-Knorpel vergleichbar. Die Inaktivierung von *sox9* mit dem Cre Rekombinase/loxP Rekombinationssystem vor der mesenchymalen Kondensation bewirkt einen Verlust der Sox5 und Sox6 Expression. Eine ebensolche Inaktivierung von *sox9* nach der mesenchymalen Kondensation führt zu Chondrodysplasien vergleichbar mit denen in der Sox5^{-/-}Sox6^{-/-} Maus. Aus diesen Daten geht hervor, dass Sox5 und Sox6 eine wichtige Funktion in der Differenzierung von Chondrozyten nach der mesenchymalen Kondensation haben und dass sie in der intrazellulären Signalkaskade unterhalb von Sox9 liegen.

Zwei weitere Transkriptionsfaktoren, die in der Chondrogenese eine wichtige Rolle spielen, sind **Runx2** (runt domain transcriptional activator), auch Cbfa1 (core binding factor1), und **Runx3**, die zur Runt Domain-Genfamilie gehören. Runx2 und Runx3 sind für die Reifung der Chondrozyten ausschlaggebend und induzieren Hypertrophie. Runx2 wird von chondrogenen mesenchymalen Zellen exprimiert, jedoch geht die Expression in Chondroblasten wieder verloren, wohingegen Runx3 aktiviert wird. Bevor die Chondroblasten beginnen, hypertroph zu werden, wird die Expression von Runx2 reaktiviert und Runx2, aber nicht Runx3, bleibt während der Entwicklung des hypertrophen Knorpels und der terminalen Differenzierung exprimiert [188; 189]. Die verstärkte Expression von Runx2 in transgenen Mäusen induziert die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten [190]. Runx2^{-/-}Runx3^{-/-} Mäusen haben überhaupt keine hypertrophen Chondrozyten [191], was zeigt, dass Runx2 und Runx3 für die Induktion der Chondrozytenreifung unumgänglich sind. Offensichtlich ist Runx2 ein direkter Transkriptionsaktivator von Markergenen der Chondrozytenreifung. Runx2 bindet *in vivo* an mehrere Erkennungsbindestellen des *coll10a1* Promotors und aktiviert *in vitro coll10a1* Reporterkonstrukte über diese Elemente [192]. Die Bindung von Runx Proteinen an die DNA wird durch Heterodimerisierung mit dem Ko-Aktivator Cbfb (core-binding factor-β) stabilisiert. Cbfb wird ebenfalls in reifenden Chondrozyten exprimiert und es ist nicht verwunderlich, dass Cbfb^{-/-} Mäuse die gleichen Störungen in der Reifung der Chondrozyten aufweisen, wie bei Runx2^{-/-} Mäusen [193; 194].

Auch die zwei Transkriptionsaktivatoren **Dlx5** und **Dlx6** (Distal-less-related homeobox transcriptional activators) fördern die Reifung der Chondrozyten und können mit Runx2 und Runx3 in dieser Funktion kooperieren. Sie werden in chondrozytären mesenchymalen

Vorläuferzellen exprimiert, gehen in Chondroblasten verloren, werden in prähypertrophen Chondrozyten reexprimiert und bleiben in hypertrophen und terminalen Chondrozyten exprimiert [195; 196]. Während eine *Dlx5*^{-/-} Maus keine gravierenden Effekte in der Chondrozytenreifung zeigt, kommt es bei *Dlx5*^{-/-}*Dlx6*^{-/-} Mäusen zu schwerwiegenden Verzögerungen in der Mineralisierung des Skeletts, offensichtlich durch verzögerte Reifung der Chondrozyten aus dem prähypertrophen Stadium [196]. Zur Vervollständigung dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine ektopische Expression von *Dlx5* in Hühnerextremitäten zu verkürzten Skelettelementen mit verfrühter Reifung der Chondroblasten zu prähypertrophen Zellen und mit ausgedehnten Zonen von hypertrophen und terminalen Chondrozyten führt [195]. *Dlx5* und *Dlx6* können durch Interaktion mit *Runx2* Chondrozytenmarker aktivieren, wie in *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte. *Dlx5* bindet an die Erkennungssequenz im *coll10a1* Promotor und aktiviert ein *coll10a1* Promotorkonstrukt [197] und interagiert zusätzlich mit *Runx2* [198].

Weitere Transkriptionsfaktoren, die im Rahmen der Chondrogenese wichtig sind und auf die hier kurz eingegangen werden soll, sind **Pax1** und **Pax9**, **Nkx3.1** und **Nkx3.2**. Pax1 und Pax9 sind Transkriptionsaktivatoren mit einer paired-box DNA-Bindedomäne, Nkx3.1 und Nkx3.2 sind Repressoren, die mit dem Drosophila *bagpipe* Faktor verwandt sind. Diese vier Transkriptionsfaktoren haben Expressionsmuster, die mit der Skelettentwicklung überlappen. Pax1 und Pax9 werden von chondrogenen mesenchymalen Zellen exprimiert, bis diese zu Chondroblasten gereift sind, wohingegen Nkx3.1 und Nkx3.2 während der Chondroblastendifferenzierung exprimiert werden [199; 200]. Die Expression von Pax1 und Pax9 wird durch Shh (Sonic hedgehog) induziert, die Expression von Nkx3.2 wiederum von Pax1 und Pax9 [201]. Mäusen mit einer Pax1^{-/-}Pax9^{-/-} Doppelmutation fehlt die Wirbelsäule [200]. In diesen Mäusen aktivieren sklerotomale Zellen *sox9* und *col2a1* und migrieren in korrekter Weise zur Chorda dorsalis, aber können nicht proliferieren. Die Expression von Sox9 und Kollagen Typ II wird beibehalten und die Zellen gehen schließlich in Apoptose. Auch Mäuse mit einer Doppelmutation von Nkx3.1^{-/-}Nkx3.2^{-/-} zeigen ähnliche Defekte wie die Pax1^{-/-}Pax9^{-/-} Maus [202; 203]. Diese Studien belegen, dass die vier Transkriptionsfaktoren essentiell für die Skelettvorläuferzellen und für deren chondrogene Kondensation sind. In Abbildung 6 soll einen Überblick über den Verlauf der Chondrogenese mit den daran beteiligten Transkriptionsfaktoren liefern.

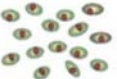

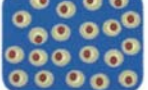
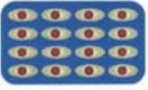

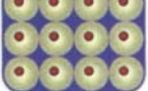

Differenzierungsstufe	Histologie	ECM-Marker	regulatorische Marker
chondrogene mesenchymale Zellen		<i>Col1a1</i>	<i>Sox9, Runx2</i> <i>Pax1, Pax9</i>
Chondroblasten-vorläuferzellen		<i>Ncam1</i> (<i>Col2a1</i>)	<i>Sox9</i> (<i>Sox5, Sox6</i>)
frühe Chondroblasten		<i>Col2a1, Agc1,</i> <i>CD-RAP</i>	<i>Sox5, Sox6, Sox9</i> (<i>Fgfr3, Nkx3.2</i>)
säulenartige Chondroblasten		<i>Col2a1, Agc1,</i> <i>CD-RAP</i>	<i>Sox5, Sox6, Sox9</i> <i>Fgfr3, Nkx3.2</i>
pre-hypertrophe Chondrozyten		<i>Col2a1, Agc1,</i> <i>CD-RAP (Col10a1)</i>	<i>Pthr1, Ihh</i> <i>Runx2, Runx3</i>
hypertrophe Chondrozyten		<i>Col10a1</i>	<i>Runx2, Runx3</i>
differenzierte Chondrozyten		<i>Mmp13, Spp1</i>	<i>Runx2</i>

Abbildung 6: Schematische Darstellung der einzelnen Phasen der Chondrozytendifferenzierung, verändert nach Lefebvre und Smits, 2005. Hervorgehoben sind die histologische Erscheinung, die Proteine der Extrazellulären Matrix und die Transkriptionsfaktoren, die charakteristisch für die jeweilige Entwicklungsstufe sind.

Für die Differenzierung der Chondrozyten sind allerdings nicht nur aktivierende Transkriptionsfaktoren notwendig. Vielmehr ist für die Richtung und die Geschwindigkeit im Ablauf der Chondrogenese ein Zusammenspiel zwischen aktivierenden und auch reprimierenden Regulatoren unumgänglich. Der Transkriptionsfaktor AP-2, der an der Melanomentwicklung beteiligt ist und dort das Tumorwachstum und die Metastasierung kontrolliert, hat auch im Rahmen der Chondrogenese eine wichtige Funktion.

2.4.1. Rolle von AP-2 in der Chondrogenese

Die funktionelle Rolle des Transkriptionsfaktors **AP-2** bei der Knorpel- und Skelettentwicklung zeigte sich erstmals in Knockout-Studien. AP-2 α Knockout-Mäuse sterben schon vor der Geburt mit gravierenden Skelettdefekten in der Entwicklung des Schädels und der Extremitäten, zusätzlich zu anderen Entwicklungsdefekten, wie einem offenen Neuralrohr und Missbildungen am Körper und an den Augen [88; 89]. Diese Erkenntnisse gehen einher mit der Detektion der Expression von AP-2 α und AP-2 γ in den Extremitätenknospen während der frühen Embryogenese [87; 204]. Mit Hilfe

immunhistochemischer Studien wurde AP-2 α Protein in der Wachstumsfuge und in Chondrozyten der Gelenke und des Meniskus detektiert [205]. Durch transiente Transfektion konnte außerdem gezeigt werden, dass AP-2 α einen biphasischen Effekt auf die Chondrozytenmarkergene *CD-RAP* (*MIA*) und *col2a1* hat. Niedrige Konzentrationen von AP-2 α steigern die Transkriptionsaktivität der Promotoren von *CD-RAP* und *col2a1*, während hohe Konzentrationen die Promotoren reprimieren [206]. Die Überexpression von AP-2 α hemmt außerdem die Expression von zwei weiteren wichtigen Matrixgenen von Chondrozyten, *aggrecan* und *col10a1*, sowie die Expression der zwei, für die Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktoren *sox5* und *sox6*. Diese Ergebnisse zeigen, dass AP-2 α ein negativer Regulator der Chondrozytendifferenzierung und für diese essentiell ist.

2.5. Osteoarthritis

Die Extrazelluläre Matrix, die von den Chondrozyten im Knorpel im Rahmen der Differenzierung abgegeben wird, dient als Schutzschicht für die darunter liegenden Knochen der Gelenke. Wenn die Knorpelschicht degeneriert ist, sind die Gelenke nicht mehr durch sie vor Abnutzung geschützt und es können sich schmerzhaft Gelenkserkrankungen entwickeln. Eine solche Erkrankung ist die Osteoarthritis (OA).

Osteoarthritis ist die häufigste Form der Arthrose, von der in etwa 12 % der Weltbevölkerung betroffen sind. Es handelt sich dabei um eine chronische, nicht-entzündliche, schmerzhaft Gelenkerkrankung, die vorwiegend durch einen Abbau des Gelenksknorpels gekennzeichnet ist. Die genauen Ursachen der Entstehung dieser Krankheit sind bis heute allerdings unklar. Die allgemein vorherrschende Hypothese über die Entstehung der Osteoarthritis besagt, dass das Gleichgewicht zwischen der Synthese und der Degeneration der Matrixmoleküle, das im intakten Knorpel besteht und für die Erhaltung und Funktion des Knorpels essentiell ist, gestört ist. Dies führt zu Umbauprozessen im Knorpelgewebe und im gelenknahen Knochengewebe, die ein Ungleichgewicht zwischen der anabolen und katabolen Aktivität der Chondrozyten zur Folge haben, wobei der Abbau von Knorpelsubstanz überwiegt.

Der Einfluss der verschiedenen Moleküle auf molekulare und zelluläre Prozesse, die die Gewebsdifferenzierung kontrollieren, ist bisher nur sehr wenig verstanden.

3. Ziel der Arbeit

In der hier vorliegenden Arbeit sollte die Rolle des Zelladhäsionsmoleküls Integrin alpha10 bei der Progression des malignen Melanoms untersucht werden. Bisher war es nicht bekannt, dass Integrin alpha10 im malignen Melanom exprimiert wird und folglich wurde auch nicht untersucht, welche Funktion Integrin alpha10 im Melanom ausübt oder wie die Expression reguliert wird.

In der Literatur ist beschrieben worden, dass Integrin alpha10 als Typ II Kollagen-bindendes Integrin von Chondrozyten exprimiert wird. Allerdings ist nicht bekannt, wie die Expression in Chondrozyten reguliert wird oder welche Funktion dieses Integrin während der Differenzierung der Chondrozyten ausübt. Mit den nachfolgenden Analysen sollte versucht werden, diese Fragestellungen zu klären, um einen Beitrag zum molekularen Verständnis der Progression des malignen Melanoms und zur Differenzierung von Chondrozyten zu liefern.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1. Zelllinien und primäre Zellen

Mel Ei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Ho	DSMZ Nr.: ACC62, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Im	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Ju	Humane Melanomzelllinie aus Metastasen eines Melanoms
Mel Juso	DSMZ Nr.: ACC74, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Mel Wei	Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
Sk Mel 28	ATCC Nr.: HTB-72, Humane Melanomzelllinie aus Primärtumor
SW1353	ATCC Nr.: HTB-94, Humane Chondrosarkomzelllinie
SW480	ATCC Nr.: CCL-228, Humane Kolonkarzinomzelllinie
Chondrozyten	Humane primäre Chondrozyten aus Knorpel
OA-Chondrozyten	Humane primäre Chondrozyten aus Knorpel von OA-Patienten
Melanozyten	Humane primäre Melanozyten aus normaler Haut
HMSC	Humane mesenchymale Stammzellen

1.2. Organismen

Epicurian Coli [®] XL2- Blue MRF	Ultracompetent Escherichia Coli
---	---------------------------------

1.3. Oligonukleotide und Plasmide

1.3.1. Primer für Expressionsanalysen

Aggrecan for:	5`- CAGTTCACCTTCCAGGAAG -`3
Aggrecan rev:	5`- GTAGAGGTAGACCGTTCTCACG -`3
AP-2 α for:	5`- GATCCTCGCAGGGACTACA -`3
AP-2 α rev:	5`- GTTGGACTTGGACAGGGAC -`3
AP-2 ϵ for:	5`- GAAATAGGGACTTAGCTCTTGG -`3

AP-2ε rev:	5'- CCAAGCCAGATCCCCAACTCTG -'3
CollagenII for:	5'- TCAACAACCAGATTGAGAGCATCCGC -'3
CollagenII rev:	5'- GATTGGGGTAGACGCAAGTCTCGCC -'3
CXCL1 for329:	5'- CCAAGAACATCCAAAGTGTG -'3
CXCL1 rev400:	5'- GTTGGATTTGTCACTGTTTCAGC -'3
Integrin alpha3 for:	5'- TGCTGTATCCCACGGAGATCACCGTC -'3
Integrin alpha3 rev:	5'- AATAGGGTAGCCCAGCCATTTACCCG -'3
Integrin alpha7b for:	5'- GCTGTGGCTGCCCTCCATCCCTTC -'3
Integrin alpha7b rev:	5'- CCCTCTAGGTTAAGGCACTTCCGGG -'3
Integrin alpha10 for:	5'- CATGAGGTTACCGCATCACT -'3
Integrin alpha10 rev:	5'- AAGGCAAAGGTCACAGTCAAGG -'3
MIA for:	5'- CATGCATGCGGTCCTATGCCCAAGCTG -'3
MIA rev:	5'- GATAAGCTTTCACTGGCAGTAGAAATC -'3
PITX1_285for:	5'- CTTCAACAAGCCAGCAGTTGC -'3
PITX1_551rev:	5'- CAGTTGTTGTAGGAGTAGCCG -'3
RGS3_for371:	5'- GAAGTCATTCAAGCCACCTC -'3
RGS3_rev601:	5'- GCCTGGATCGCGATGTATTC -'3
RGS12_1721:	5'- CTCGCTGGTGACCATGAAGA -'3
RGS12_1927:	5'- CATGAACACGTGGCAGGAAG -'3
RUNX1_286for:	5'- AACTTCCTCTGCTCCGTGCT -'3
RUNX1_573rev:	5'- TCTGTGGTAGGTGGCGACTT -'3
SMAD7for:	5'- TTTGCCTCGGACAGCTCAATTTCGG -'3
SMAD7rev:	5'- CTCGTAGTCGAAAGCCTTGATGGAG -'3
SOX5for186:	5'- CAGCCAGAGTTAGCACAATAG -'3
SOX5rev468:	5'- GCACTTCCATCAGAATCTCC -'3
TGFβ3_for:	5'- CCCTGACCATCCTGTACTATGTTGGG -'3
TGFβ3_rev:	5'- GGGTAGCCCCAAATCCCATTGCCACAC -'3

1.3.2. Primer für Promotorklonierungen

ITGA10-for 1139:	5'- GACGCTAGCACCTAGCTGAGGAGTTGG -'3
ITGA10-for 960:	5'- GACGCTAGCGGAGCTGTGTCTTCACAAG -'3
ITGA10-for 350:	5'- GACGCTAGCGAATCCATCTCCCACTCC -'3
ITGA10prom-rev:	5'- GACAAGCTTGCCTGATCGGTTTCTGTC -'3

1.3.3. Oligonukleotide für EMSA

wt Ets-1:	5` - CGCTCAGTGTTTTTCCTTGGCTTGGG -`3
mut Ets-1:	5` - GATCGCTCAGTGTTGATCATGGTCTGGGGCTCCCC -`3
AP-2-I:	5` - GTTTTCCTTGGTCTGGGGCTCCCCACAGTTC -`3
AP-2-II:	5` - GTTCAAGACCAGCCTGGCCAACATGG -`3
AP-2-III:	5` - CGGAGGCCGAGGCAGGTGGATCTC -`3

1.3.4. Vektoren, Plasmide

pcDNA3	Invitrogen, California, USA
pGL3-basic	Promega Corporation, WI, USA
pRL-TK	Promega Corporation, WI, USA

1.4. Bezugsquellen von Enzymen, Proteinen und Chemikalien

Amersham, Braunschweig	[$\gamma^{32}\text{P}$]-dATPs, 3000 Ci/mmol, NICK™- Columns, Streptavidin Sepharose High Performance
BD Discovery Labware	Falcon™, Einmalartikel für Zellkultur, Polystyrene Round-Bottom Tube
Boston, USA	ITS, Premix für Incomplete Chondrogenesis Induction Medium
Behrens, Hamburg	Agar
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran
BioWhittaker Molecular Applications, Rockland, ME USA	SeaKem® LE Agarose
Cartela AB, Lund, Schweden	Anti-Integrin alpha10 Antikörper
Corning Incorporated Costar, New York	High Binding Stripwell Plates
DakoCytomation, Dänemark	Alkalische Phosphatase konjugiertes Streptavidin
Invitrogen, California, USA	SuperScript™ II RNase H ⁻ Reverse Transkriptase
	SeeBlue® Plus2, Ready- Load™ 100 bp DNA Ladder
	Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent
Macherey-Nagel GmbH & Co. KG	NucleoBond® Xtra Midi Plus

MWG Biotech, Martinsried	Oligonukleotide
PAN TM Biotech GmbH, Aidenbach	DMEM
	FCS (Fötales Kälberserum)
	PBS
	Penicillin
	Streptomycin
	Trypsin
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
PromoCell, Heidelberg	Melanocyte Growth Medium
Qiagen, Hilden	RNeasy [®] Mini Kit
	QIAquick [®] Gel Extraction Kit
Riedel de Haen, Seelze	Ethanol
	Methanol
Roche Diagnostics, Mannheim	ABTS (2,2'-azino-di-[3-ethylbenzthiazolinsulfonat])
	COMPLETE-Proteinaseinhibitormix
	Ethidiumbromid
	Nonidet [®] P40
	Restriktionsendonukleasen: <i>EcoRI</i> , <i>HindIII</i> , <i>NheI</i>
	RNaseA
	<i>Taq</i> -DNA-Polymerase
Roth, Karlsruhe	Roti [®] Load1 4x Puffer
	Roti [®] Load 4x Puffer (nicht denaturierend)
Sigma, St. Louis, USA	Acrylamid 40% Lösung
	Bromphenolblau
	BSA
	Monoclonal anti- β -Aktin Antikörper
	TEMED
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli [®] XL2- Blue MRF ⁺ Ultracompetent Cells
Takara Bio Inc, Japan	SYBR [®] Premix Ex Taq TM (Perfect Real Time)
Whatman International Ltd, Maidstone, England	Whatman 3MM Filterpapier
	Nucleopore [®] Track- Etch Membrane

Zymed Laboratories Inc, San Francisco, BCIP/NBT Substrate Kit
USA

1.5. Geräte

Blotapparaturen:

Whatman Biometra, Göttingen

Minigel Twin, Fastblot B34

Gelelektrophoreseapparaturen:

Amersham pharmacia biotech

Elektrophoresis Power Supply EPS 301

BioRad, München

Wide Mini Sub[®] Cell GT

Heiz- und Kühlblöcke:

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer 5436

Thermomixer comfort

Thermomixer compact

Mikroskope:

Leitz, Wetzlar

Labovet FS, Aristoplan

Zeiss, Jena

Axiovert 10, ICM 405

Spannungsgeräte:

BioRad, München

Modell 200/2.0 power supply, Consort E455

Waagen:

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen:

Eppendorf, Hamburg

Centrifuge 5415C, MiniSpin Plus

Hereaeus, Hanau

Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0

Kisker, Steinfurt

Tischzentrifuge

Sonstige Geräte:

Bachofer, Reutlingen

UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm

Bühler, Edmund, Tübingen	Schüttler SM 25
Beckton Dickinson	Facs Calibur
Bertin Technologies, Sceaux, France	PRECELLYS [®] 24 Homogenisator
Heidolph, Kehlheim	Magnetrührer MR 2000, MR 2002 Vortexer REAX 2000
Kendro Laboratories, Hanau	Herasafe, Sicherheitswerkbank Zellinkubator CO ₂ - Auto- Zero
IKA-Labortechnik, Staufen	Schüttler IKA-Vibrax VXR
MJ Research, Waltham, USA	Peltier Thermal Cycler PTC- 200
Tuttnauer/Systec, Wettenberg	Autoklav 2540 EK
WTW, Weilheim	pH-Meter pH522

2. Medien, Antibiotika und Puffer

2.1. Medien zur Anzucht von E.coli und Zellkulturen

Luria Bertani Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Substanzen wurden in H ₂ O _{bidest} gelöst und autoklaviert Für Platten: + 15 g/l Agar Zur Selektion: + 100 µg/ml Ampicillin
DMEM	Zusätze: 10 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin (PS)
DMEM High Glucose	10 % (v/v) FKS 0,1 % (w/v) Penicillin/Streptomycin (PS) zusätzlich 4,5 g/l Glukose

Incomplete Chondrogenesis Induction Medium	DMEM High Glucose + 0,1 % PS 1 mM Natrium Pyruvat 0,17 mM L-Ascorbinsäure 2-Phosphat 0,35 mM L-Prolin 0,1 µM Dexamethason 1 % ITS+Premix
Für Complete Chondrogenesis Induction Medium	0,01 µg/ml TGF-β3 (frisch ansetzen)
Einfriermedium	Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10% FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

2.2. Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung (500x)	50 mg/ml in dest. H ₂ O (-20°C)
Geneticin- Stammlösung	100 mg/ ml in dest. H ₂ O (-20°C)

2.3. Puffer und Lösungen

2.3.1. Lösungen für Agarosegelelektrophorese

TAE-Puffer (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1-2 % (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (10x)	0,25 % (w/v) Bromphenolblau 0,25 % (w/v) Xylencyanol 40 % (v/v) Sucrose
Ethidiumbromidlösung	0,04 % in H ₂ O bidest

2.3.2. Lösung zur Isolierung von Gesamtprotein

RIPA Puffer	50 mM Tris- HCl, pH 7,5
	150 mM NaCl
	1 % Nonidet® P40
	0,5 % Natriumdesoxycholat
	0,1 % SDS

2.3.3. Puffer zur Isolierung von Kernproteinen

Puffer I	10 mM Hepes, pH 7,9
	10 mM KCl
	0,1 mM EDTA
	0,1 mM EGTA
	1 M DTT
Puffer II	20 mM Hepes
	0,4 M NaCl
	1 mM EDTA
	1 mM EGTA
	1 M DTT

2.3.4. Gellösungen und Puffer für SDS-Polyakrylamidgelelektrophorese

SDS-Page-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5
	200 mM Glycin
	0,1 % (w/v) SDS
12,5 %-Trenngel	31,25 % (v/v) Acrylamid:Bis 40 %
	37,5 % (v/v) 1 M Tris pH 8,8
	0,1 % (v/v) SDS
	0,05 % (v/v) APS
	0,05 % (v/v) TEMED

4 %-Sammelgel	10 % (v/v) Acrylamid
	12 % (v/v) 1 M Tris pH 6,8
	0,1 % (v/v) SDS
	0,05 % (v/v) APS
	0,05 % (v/v) TEMED

2.3.5. Puffer für Western Blot

Blotpuffer	25 mM Tris/ HCl, pH 8,5
	190 mM Glyzin
	10 % Methanol

2.3.6. Gellösungen und Puffer für Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)

Natives Polyacrylamidgellösung (6 %)	8 ml Acrylamid (30 %)
	1 ml 10x TBE
	200 µl APS
	50 µl TEMED
	H ₂ O ad 40 ml
5x Bindepuffer	25 mM Hepes, pH 7,8
	25 mM MgCl ₂
	250 mM KCl
	1 mM EDTA
	25 mM DTT
	50 % Glyzerin
Ladepuffer	80 % Formamid
	10 mM NaOH
	1 mM EDTA
	0,1 % Xylencyanol Blau
	0,1 % Bromphenolblau
Laufpuffer 1x TBE	10x TBE:
	900 mM Tris/ HCl
	900 mM Borsäure
	20 mM EDTA

3. Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten, sowie Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben sind, wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

3.1. Nukleinsäure-Analytik

3.1.1. RNA Isolation aus Säugerzellen

Die Isolation von RNA aus Zellen und Gewebe erfolgte mit dem RNeasy® Mini Kit der Firma Qiagen. Dazu wurde das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgenommen und die Kultur einmal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber in 1 ml PBS von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgeschabt und bei 4000 rpm/min für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 350 µl RNA Lysispuffer des RNeasy Kits resuspendiert und lysiert. Da sich die Zellen sehr leicht lysieren lassen, ist kein weiterer Schritt zum Zellaufschluss notwendig.

Zur Isolation von RNA aus Gewebe wurde dieses zunächst zerkleinert und anschließend mit einem Mörser (Roth, Karlsruhe) in 350 µl RNA Lysispuffer des RNeasy Kits lysiert und über Schredder-Säulchen aus dem Kit laufen gelassen, um größere Fragmente zu entfernen. Die RNA Isolation wurde nach dem beiliegenden Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die in 30 µl H₂O (RNase-frei) eluierte, extrahierte RNA wurde bei –20°C eingefroren.

3.1.2. Reverse Transkription (cDNA Synthese)

Für die reverse Transkription wurde pro Reaktionsansatz etwa 1 µg Gesamt-RNA, die aus Zellen oder Gewebe mit dem RNeasy® Mini Kit von Qiagen extrahiert wurde, eingesetzt. Die Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt, der sich aus 4 µl First Strand buffer (5x), 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 µl dN₆ Primer (random, 2 mg/ml), 2-4 µl RNA und H₂O ad 20 µl zusammensetzte.

Der Reaktionsansatz wurde zum Denaturieren der RNA zunächst 5 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde nach Abkühlen auf etwa 50°C 1 µl Superscript II hinzugegeben. Die reverse Transkription erfolgte dann bei 37°C für 60 min. Dann wurde der Ansatz bei 70°C für

10 min zur Hitzeinaktivierung des Enzyms inkubiert und nach einem RNase Verdau mit 1 µl RNaseA Mix für 30 min bei 37°C konnte die cDNA bei –20°C eingefroren werden.

3.1.3. Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Durch die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) konnten bestimmte Abschnitte von verschiedenen Genen amplifiziert und analysiert werden. Als Matrize wurde die cDNA von Zelllinien oder primären Zellen verwendet und mit bestimmten Primern, die jeweils spezifisch für das zu analysierende Gen waren, wurde die PCR durchgeführt. Da die Hybridisierungstemperatur für jedes Primerpaar unterschiedlich ist, musste diese zunächst optimiert werden.

Die PCR wurde standardmäßig in einem 50 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Ein Ansatz enthielt 5 µl 10x Reaktionspuffer, 1 µl cDNA, 0,5 µl je Primer (20 µM), 0,5 µl dNTP-Mix (10 mM), 1 U *Taq*-DNA-Polymerase und 41,5 µl H₂O. Die Amplifikation erfolgte in einem Thermocycler (MJ Research, USA) für 36 Zyklen mit folgendem Programm: 60 sec 94°C zur Denaturierung, 1 min bei der, für das jeweilige Primerpaar etablierten Temperatur (55-64°C), 90 sec bei 72°C. Abschließend wurden die Proben auf 4°C gekühlt und jeweils 10 µl pro Ansatz auf einem analytischen Agarosegel überprüft.

3.1.4. Quantitative Echtzeit PCR

Die Quantifizierung der Expressionsstärke von mRNA wurde in einer quantitativen RT-PCR Reaktion, mit Hilfe des LightCycler II Systems, von Roche Diagnostics, Mannheim durchgeführt. Die Reverse Transkription erfolgte zuvor nach dem in 3.1.2. beschriebenem Protokoll.

Das LightCycler System erlaubt eine quantitative und qualitative PCR mit Hilfe des Farbstoffes SybrGreen I. Dieser fluoresziert, wenn er in doppelsträngige DNA (dsDNA) interkaliert. Zur Überprüfung der Qualität der Produkte wird im Anschluss an die letzte Elongationsphase der PCR eine Schmelzpunktanalyse zur Identifizierung des spezifischen Produktes durchgeführt, da jedes Produkt eine charakteristische Schmelztemperatur (T_M) hat, die sowohl von der Produktlänge als auch vom dessen GC-Gehalt abhängig ist.

Der Beginn der exponentiellen Produktzunahme, der linearen Logphase der PCR, wird aufgrund der Fluoreszenzzunahme bestimmt und entspricht dem sogenannten *crossing point*. Dieser korreliert mit der Anfangskonzentration der zu amplifizierenden cDNA-Sequenz und kann deshalb zur Quantifizierung der Transkripte herangezogen werden.

Die quantitative RT-PCR Reaktion wurde in einem 20 µl Ansatz durchgeführt und enthielt 10 ng cDNA Template, 2 µl LightCycler DNA Master SYBR Green I (10x), 2,4 µl MgCl₂ (25 mM), je 0,5 µl Primer (20 mM) und H₂O_{bidest} ad 20 µl. Die Reaktion wurde im LightCycler II mit folgendem Programm durchgeführt: Denaturierung: 1 Zyklus: 20°C/ sec auf 95°C, 30 sec; Amplifikation: 40 Zyklen: 20°C/ sec auf 95°C, 15 sec; 20°C/ sec auf 60°C (diese Temperatur variiert je nach Primerpaar), 5 sec; 20°C/ sec auf 72°C, 10 sec; Messtemperatur: 20°C/ sec auf 82°C. Zur Analyse der Schmelzkurve folgte: 1 Zyklus: 20°C/ sec auf 95°C, 15 sec; 20°C/ sec auf 65°C, 15 sec; 20°C/ sec auf 95°C, 15 sec; 0,1°C/ sec auf 40°C.

Als Standard zur Quantifizierung der mRNA Expressionsstärke wurde die PCR zusätzlich für das Haushaltsgen beta-Aktin mit durchgeführt.

3.1.5. Agarosegelelektrophorese

Der Nachweis von PCR-Produkten erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Mit dieser Methode werden DNA-Moleküle ihrer Größe nach aufgetrennt. Je kleiner ein nachzuweisendes DNA-Fragment ist, desto mehr Agarose enthält das Gel, wodurch es engmaschiger und die Auftrennung der DNA-Fragmente besser wird. Meist wurden 0,8, 1,0 oder 1,5 %ige Agarosegele verwendet.

Die PCR-Proben wurden mit 1/10 Volumen DNA-Probenpuffer versetzt und nach der Polymerisation des Gels in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt bei 110 Volt in 1x TAE-Puffer. Um die aufgetrennte DNA sichtbar zu machen, wurde das Gel im Anschluss an den Gellauf für 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (3 µg/ml) gelegt, wobei das Ethidiumbromid in die doppelsträngige DNA interkaliert. Danach konnte das Gel unter UV-Licht bei 254 nm analysiert und fotografiert werden, da Ethidiumbromid UV-Licht absorbiert und im sichtbaren Bereich fluoresziert.

3.1.6. Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus präparativen Agarosegelen erfolgte nach dem QIAquick Gel Extraction Kit der Firma QIAGEN. Hierfür wurde die DNA mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, die Bande des DNA-Fragmentes mit der gewünschten Größe mit einem Skalpell ausgeschnitten, das Gelstück mit der DNA in ein Eppendorfgefäß überführt und gewogen. Nach Zugabe von 3 Volumenteile Puffer QG wurde die Agarose bei 50°C für 10 min geschmolzen. Durch die Zugabe von 1 Gelvolumen Isopropanol ließ sich die DNA-Ausbeute erhöhen. Durch Zentrifugieren des Ansatzes über eine, im QIAquick Gel

Extraction Kit enthaltene Säule, wurde die DNA an das Säulenmaterial gebunden, anschließend mit 750 µl Puffer PE gewaschen und schließlich mit 30 µl H₂O_{bidest} durch Zentrifugation von der Säule eluiert.

3.1.7. Herstellung radioaktiv markierter EMSA Matrize

Die radioaktive Markierung des doppelsträngigen (ds) DNA-Oligonukleotides erfolgte durch eine blunt-end Reaktion. Um ein doppelsträngiges DNA-Fragment zu generieren, wurden die forward und reverse Oligonukleotide im Verhältnis 1:1 mit H₂O gemischt und für 5 min auf 95°C erhitzt. Beim langsamen Abkühlen des Heizblocks auf Raumtemperatur kam es zur Zusammenlagerung der Oligonukleotide zu einem Doppelstrang. Die so entstandene blunt-end dsDNA wurde dann radioaktiv markiert. Ein 20 µl Reaktionsansatz enthielt 3 µl dsOligonukleotid, 2 µl Polynukleotidkinase Puffer (10x), 11 µl H₂O, 1 µl Polynukleotidkinase und 3 µl [γ -³²P] ATP. Dieser Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert, wobei eine radioaktiv markierte Phosphatgruppe durch die Polynukleotidkinase auf die dsDNA übertragen wurde.

3.1.8. Reinigung radioaktiv markierter DNA-Fragmente

Zur Trennung radioaktiv markierter DNA-Fragmente von freien, nicht eingebauten Nukleotiden wurden NICK™- Columns der Firma Amersham verwendet. Der Reaktionsansatz der radioaktiven Markierung mit ³²P wurde auf die Säule aufgebracht und anschließend mit 200 µl TE- Puffer (pH 7,5) gespült. Die erste Fraktion, die man erhielt, wurde aufgefangen und verworfen, da sie hauptsächlich aus Puffer mit nur sehr geringen Anteilen an radioaktiv markierter EMSA-Matrize bestand. Durch dreimaliges Spülen der Säule mit je 200 µl TE- Puffer konnten noch drei weitere Fraktionen gewonnen werden, wobei die markierte dsDNA Matrize mit der dritten und vierten Fraktion von der Säule gespült wurde. Freie Nukleotide wurden in der Säule zurückgehalten. Für die Gelshift Assays wurde jeweils diejenige Fraktion genutzt, die die höchste Effizienz der Markierung aufwies.

3.1.9. EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay)

Um DNA-Protein-Wechselwirkungen *in vitro* analysieren zu können, wurden Elektrophoretic Mobility Shift Assays (EMSAs) durchgeführt. Diese Methode beruht auf einem veränderten Laufverhalten von DNA-Fragmenten mit gebundenen Proteinen im Gegensatz zu freier DNA

in nativer Gelelektrophorese. Der Nachweis der DNA-Proteinkomplexe erfolgt über die radioaktive Markierung der DNA-Matrize. Ein Reaktionsansatz für den EMSA enthielt 5-10 µg Kernprotein, 4 µl 5x EMSA Binding Puffer, 1 µl poly dIdC (1 mg/ml), 2 µl radioaktiv markiertes Oligonukleotid (20000 cpm/µl) und H₂O_{bidest} ad 20 µl. Der Ansatz wurde zunächst für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, damit die, im Kernextrakt enthaltenen, nachzuweisenden Proteine an die DNA-Matrize binden können. Zum Nachweis der spezifischen Bindung des Proteins an die DNA-Matrize wurde in Kontrollansätzen unmarkiertes Oligonukleotid in 400-fachem Überschuss als Kompetitor zugegeben. Die Ansätze wurden vor dem Auftragen auf ein natives, 4,5 % Polyacrylamidgel mit 4 µl Ladepuffer beschwert. Das Gel lief bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm in 1/4x TBE für ca. 2,5 h. Nach dem Trocknen auf Whatman-Filterpapier auf einem Vakuumgeltrockner konnte das Gel autoradiographisch analysiert werden. Hierfür wurde ein Röntgenfilm (Kodak Biomax MR, Scientific Imaging Film) für etwa 24 h aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.1.10. Nachweis radioaktiver Produkte durch Autoradiographie

Radioaktiv markierte Nukleinsäurebanden in Gelen oder auf Membranen lassen sich durch Auflegen eines Röntgenfilmes detektieren. Durch die Strahlungsenergie der Radioisotope werden Silberhalogenidkristalle, die in die Festphase des Röntgenfilmes eingebettet sind, negativ geladen und zu metallischem Silber reduziert. Daraus ergibt sich ein latentes Bild aus Silberpartikeln. Die Entwicklung des Filmes verstärkt dieses Bild und die anschließende Fixierung entfernt überschüssiges Silberhalogenid. Da die Filmschwärzung innerhalb eines bestimmten Strahlungsbereiches direkt proportional zur Menge an radioaktiver Strahlung ist, können Autoradiogramme quantitativ ausgewertet werden. Die Expositionszeit des auf den Röntgenfilm aufgelegten Gels richtet sich nach der Qualität und Quantität der radioaktiven Strahlung.

3.1.11. Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) und Promotorarray

Zur Identifizierung von Zielgenen, an deren Promotor AP-2ε *in vivo* bindet, wurde zunächst eine Chromatin Immunpräzipitation (ChIP) mit einem spezifischen anti-AP-2ε Antikörper und anschließend ein GeneChip® Human Promoter 1.0R Array der Firma Affymetrix durchgeführt.

Die Chromatin Immunpräzipitation erfolgte nach dem Protokoll der Firma Affymetrix gemäß deren Angaben. Es wurden frisch isolierte Chondrozyten eines Osteoarthritispatienten

verwendet. Diese wurden mit Formaldehyd fixiert, um die DNA mit den daran gebundenen Faktoren zu vernetzen. Die Zellen wurden dann lysiert und die DNA durch Sonifikation in kleinere Fragmente zerteilt. Durch Immunpräzipitation einem spezifischen anti-AP-2 ϵ Antikörper wurden anschließend die DNA-Fragmente isoliert, an die AP-2 ϵ gebunden hat. Dies sind Promotorbereiche von Genen, mit denen der Transkriptionsfaktor zur Regulation assoziiert. In den folgenden Schritten wurde der Crosslink der Proteine mit der DNA wieder aufgehoben, die Proteine mittels Protease-Behandlung verdaut und die gereinigten DNA-Fragmente mit einer PCR Methode, bei der Random-Primer verwendet wurden, amplifiziert. Die DNA-Fragmente wurden dann markiert und auf den GeneChip[®] Human Promoter 1.0R Array hybridisiert. Zur Auswertung des Arrays wurden die Hybridisierungssignale der Positivprobe mit denen der Negativprobe verglichen. Für die Positivprobe wurde der spezifische anti-AP-2 ϵ Antikörper verwendet, bei der Negativprobe wurde kein Antikörper verwendet, um unspezifische Hintergrundsignale ausschließen zu können. Es konnten so diejenigen Promotorregionen und somit diejenigen Gene identifiziert werden, an die AP-2 ϵ *in vivo* bindet.

Der GeneChip[®] Human Promoter 1.0R Array wurde in Kooperation mit dem Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg durchgeführt. Einige signifikante Ergebnisse des Promotorarrays wurden durch quantitative Echtzeit-PCR bestätigt.

3.2. Proteinanalytik

3.2.1. Herstellung von Proteinextrakten

Zur Extraktion von Gesamtprotein aus Säugerzellen wurde zunächst das Kulturmedium von konfluent wachsenden Zellen abgesaugt und diese mit PBS gewaschen. Durch Abschaben mit einem Zellschaber wurden die Zellen in 1ml PBS geerntet und bei 3000 rpm/min für 5 min pellettiert. Die Zellen wurden dann für 15 min bei 4°C im Schüttelinkubator in 200 μ l RIPA-Puffer lysiert. Durch Zentrifugieren für 10 min bei 13.000 rpm/min bei 4°C lassen sich die gesamten Zellproteine im Überstand gewinnen, während DNA, RNA und Zellbruchstücke sedimentiert werden. Der Proteinextrakt wurde in neue Cups überführt und bei -20°C eingefroren. Alle Präparationsschritte erfolgen auf Eis, die Zentrifugationsschritte bei 4°C.

3.2.2. Herstellung von Kernproteinextrakten

Zur Isolation von ausreichend Kernprotein wurden die Methode nach Dignam et al., 1983 [207] verwendet. Es wurden Melanomzellen bis zu einer Zelldichte von mindestens 90 % in einer T75 Kulturflasche herangezogen. Vor Beginn der Präparation wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber in 1 ml PBS abgeschabt und bei 3000 rpm/min für 5 min pelletiert. Zur Lyse der Zellmembran wurden 400 µl Puffer I (siehe 2.3.3.) zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Inkubation wurde zur Verbesserung der Lyse 10 %iges Nonylphenylpolyethylene Glykol NP-40, ein nichtionisches Tensid, zugegeben. Die Kernfraktion wurden bei 10.000 rpm/min für 1 min abzentrifugiert und der Überstand, der das Zytoplasma enthält, verworfen. Das Kernpellet wurde durch Zugabe von 50 µl Puffer II (siehe 2.3.3.) lysiert, indem es 15 min bei 4°C geschüttelt wurde. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm/min befanden sich die Kernproteine im Überstand. Die Kernproteinextrakte wurden sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen konnten diese nicht erneut eingefroren und wieder verwendet werden, da es dabei zu einer Degradation der Proteine kommt.

3.2.3. Isolation von Proteinen aus Zytoplasma, Membran und Zellkern

Der ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit der Firma Calbiochem wurde verwendet, um Proteine seriell aus Zytoplasma, Membran, Kern und Zytoskelett getrennt voneinander zu isolieren.

Zunächst wurden Zellen, die zu 80 % konfluent in T75 Zellkulturschalen gewachsen sind, mit PBS gewaschen, um Medium- und Serumreste zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit einem Zellschaber aus der Zellkulturschale gelöst und in 1ml PBS pelletiert. Alle folgenden Schritte wurden bei 4°C und auf Eis durchgeführt. Das Zellpellett wurde in Extraktionspuffer I des Proteome Extraction Kits, dem zusätzlich Proteaseinhibitor zugesetzt wurde, aufgenommen. Nach einer Inkubation für 15 min bei 4°C auf dem Schüttler wurde erneut zentrifugiert (10 min, 3000 rpm). Der Überstand, der die Zytoplasmafraktion enthält, wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Das vorliegende Pellett wurde in Extraktionspuffer II aufgenommen und nach Inkubation auf dem Schüttler bei 4°C (30 min) erneut zentrifugiert (10.000 rpm, 10 min). Dieser Überstand enthielt die Membranproteine und wurde in ein neues Cup überführt. Zu dem Pellet wurde der Puffer III gegeben, welcher nach einer erneuten Inkubation (siehe oben) zu einer Trennung von Kernproteinen im Überstand und dem Pellet, welches Proteine des Zytoskeletts enthält, führte. Die Proteine des

Zytoskeletts wurden am Ende in Puffer IV aufgenommen. Alle Fraktionen mussten bei -20°C eingefroren werden.

3.2.4. Herstellung von Proteinextrakten aus Gewebe

Zur Isolation von Proteinen aus Geweben wurden diese mit dem PRECELLYS® 24 Homogenisator (bertin technologies, Sceaux, France) in 200 µl RIPA-Puffer homogenisiert. Unlösliche Fragmente wurden dann durch anschließendes Zentrifugieren für 10 min bei 13.000 rpm/min entfernt. Der Überstand, in dem die Proteine enthalten waren, wurde umgehend in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.5. Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde der BCA-Protein-Assay Kit der Firma Pierce, München, verwendet. Dieser basiert auf der Methode von Smith et al., 1985 [208], bei der es zu einer alkalischen Reduktion von Cu^{2+} zu Cu^+ (Biuret Reaktion) durch Proteine kommt. Das Cu^+ bildet mit Bicinchromsäure (BCA) einen Farbkomplex, der durch photometrische Messung bei 562 nm quantifiziert werden kann. Zu 5 µl Gesamtproteinlösung bzw. 1 µl Kernproteinlösung mit 4 µl Wasser, wurden 200 µl alkalische BCA-Kupfer (II) Lösung (50 Teile Lösung A mit einem Teil Lösung B) in eine 96-Well Platte gegeben und für ca. 15 min bis zur Färbung der Lösung bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorption bei 562 nm wurde anschließend durch Messung der Platte in einem ELISA-Reader bestimmt. Durch die parallele Quantifizierung eines mitgeführten BSA-Standards über drei Zehnerpotenzen ließ sich die Absorption dann in Proteinkonzentrationen umrechnen.

3.2.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht diente die vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 [209]. Durch die Anlagerung von SDS-Molekülen werden dabei die Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen durch das Aufspalten von Wasserstoffbrückenbindungen zerstört, sowie Ladungsunterschiede neutralisiert. 40 µg Proteinlysate wurden jeweils in 1 x Roti-Load Probenpuffer für 10 min bei 70°C aufgeköcht und anschließend unter Verwendung eines SDS-haltigen, diskontinuierlichen Tris-HCl/ Tris-Glycin-Puffersystems bei 0,8 mA/cm² durch SDS-PAGE

in Polyacrylamidgelen zusammen mit einem Größenstandard (SeeBlue® Plus2, Invitrogen, California, USA) aufgetrennt.

3.2.7. Western Blot

Für den Nachweis bestimmter Proteine mittels Antikörper wurden die, durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet. Diese musste zunächst 10 min in Methanol und 10 min in 1x Blotpuffer getränkt werden. Es wurden dann drei in Blotpuffer getränkte Whatman-Filterpapiere, die PVDF-Membran, das SDS-PAGE-Gel und wiederum drei getränkte Whatman-Filterpapiere luftblasenfrei auf die Blot-Apperatur gestapelt (Sandwich-Methode). Mittels elektrophoretischem Transfer (Whatman Biometra, Fastblot B34 Unit, 1 h bei 1,5 mA/cm²) wurden die Proteine dann auf die Membran übertragen.

3.2.8. Proteindetektion mittels Western-Blot

Zur spezifischen Proteindetektion wurde die Western-Blot-Membran zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h bei RT in TBST (0,05 % Tween) mit 3 % BSA inkubiert und dann über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:1000-1:5000), der gegen das zu detektierende Protein gerichtet ist, geschwenkt. Nach dem Waschen (3 x 10 min mit TBST) wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper (1:4000), der gegen den konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet (speziesspezifischen) und mit einer Alkalischen Phosphatase konjugiert ist, für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran wiederum 3 x 10 min mit TBST gewaschen, danach das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und im Dunkeln inkubiert, bis sich eine Farbreaktion zeigte.

3.2.9. Immunhistochemie

Zur *in vivo* Analyse der Expression von Integrin alpha10 und AP-2ε in Geweben wurden mit Hilfe von spezifischen Antikörpern immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten durchgeführt. Für den Nachweis der Expression von Integrin alpha10 wurden Kryoschnitte von primärem Melanom und Metastasen verwendet, der Nachweis von AP-2ε erfolgte an Paraffinschnitten von Knorpel und OA- und RA-Knorpel. Die Gewebe wurden durch Inkubation in einer absteigenden Alkoholreihe fixiert, für 10 min mit H₂O₂ behandelt, um freie Radikale abzufangen, zum Blockieren von unspezifischen Bindestellen mit Kälberserum

geblockt und anschließend mit dem jeweiligen spezifischen Primärantikörper (anti-Integrin $\alpha 10$ Antikörper, 1:120 und anti-AP-2 ϵ Antiserum, 1:200) über Nacht bei 4°C inkubiert. Der Biotin-gekoppelte anti-rabbit Sekundärantikörper der Firma DAKO (Deutschland) wurde für 30 min auf die Schnitte gegeben. Es folgte eine Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (DAKO) für 30 min. Die Bindung der Antikörper konnte mit Hilfe von AEC-Lösung (DAKO) sichtbar gemacht werden, wobei es zu einer Umsetzung des Farbstoffes durch die, an das Streptavidin gekoppelte Peroxidase kommt. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Hämalaun-Lösung (DAKO) gefärbt, um die Zellkerne sichtbar zu machen.

3.3. Zellkulturmethoden mit humanen Zelllinien

3.3.1. Kultivierung von eukaryontischen Zellen

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % FKS und 1 % Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese zunächst mit PBS gewaschen und dann mit 0,05 % Trypsin bei Raumtemperatur inkubiert, bis sie sich nach ca. 5 min vom Boden der Zellkulturflasche gelöst haben und in DMEM mit 10 % FKS aufgenommen. Um das Trypsin aus dem Medium zu entfernen, wurden die Zellen bei 1200 rpm/ min zentrifugiert, der Überstand abgenommen, das Zellpellett in DMEM mit 10 % FKS gelöst und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Wechsel des Zellkulturmediums erfolgte jeden zweiten Tag.

3.3.2. Transfektion von Zellkulturzellen

Zur Transfektion der Zellen wurde die Lipofektamin Methode mit Lipofektamin™ Reagent und Lipofektamin^{plus} Reagent verwendet, um möglichst hohe Transfektionsraten zu erreichen. Nachdem die Zellen, die in 6-well Kulturschalen ausgesät wurden, bis zu 50-80 % konfluent gewachsen sind, wurde das Medium nochmals gewechselt und anschließend der Transfektionsansatz hinzu pipettiert. Dieser wurde nach Protokoll und Mengenangaben des Herstellers vorbereitet, wobei 0,05 bis 0,5 µg an Plasmid-DNA pro Versuchsansatz eingesetzt wurden. 4 h nach der Transfektion wurde das Medium erneut gewechselt und die Zellen bis zur Ernte weitere 24-48 h inkubiert. Transfizierte Zellen wurden entweder für Luciferase-Reportergen-Analysen genutzt oder es wurde das Gesamtzellprotein bzw. die RNA isoliert.

Zur Herstellung von stabil transfizierten Zelllinien wurde der Vektor mittels der Lipofektaminmethode in die Zellen eingebracht und durch Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums zum Kulturmedium ein Selektionsdruck aufgebaut. Das Selektionsantibiotikum wurde anhand eines Resistenzgens im Vektor, der in die Zellen eingebracht wurde, ausgewählt. Durch Verwendung eines Selektionsmediums konnten nur diejenigen Zellen, die den gewünschten Vektor aufgenommen hatten, überleben.

Für die transiente Transfektion wurden Expressionskonstrukte der Gene Ets-1 und AP-2, kloniert in den Expressionsvektor pcDNA3, verwendet.

Zur Herstellung von Zellklonen mit verminderter Integrin $\alpha 10$ Expression wurde ein Fragment der Gensequenz in AS-Orientierung in den Vektor pcDNA3 kloniert.

3.3.3. Luciferase-Reportergen-Assay

Regulatorische DNA-Sequenzen lassen sich mit Hilfe von Reportergen-Analysen untersuchen. Für Transfektionen, die für anschließende Luciferase-Reportergen-Analysen durchgeführt wurden, wurde als Plasmid ein Luciferase-Vektor verwendet. Um die Aktivität eines Promotors zu untersuchen, wird ein DNA-Fragment, das den Promotorbereich enthält, vor das *Luciferase*-Gen des Reporterplasmids pGL3-basic kloniert. Die Expression des Reportergens verhält sich im eukaryotischen Testsystem proportional zum Aktivierungspotential des klonierten DNA-Fragments. Durch Zugabe eines Substrats (Luciferin) für das Enzym Luciferase kommt es zur Chemilumineszenz, welche an einem Luminometer gemessen wird. Um die unterschiedliche Transfektionseffizienz der einzelnen Versuchsansätze anzugleichen, wurden die Zellen zusätzlich mit einem Kontrollvektor (pRL-TK, Promega, Heidelberg), der das Renilla Luciferase Gen aus *Renilla reniformis* enthält, kotransfiziert. Die Chemilumineszenz der Renilla Luciferase wurde ebenfalls im Luminometer erfasst.

Zur Durchführung des Luciferase Assays wurde der *Luciferase Assay Kit* der Firma Promega verwendet. Hierfür wurden je 200.000 Zellen pro Well in 6-Well Platten ausgesät und nach der Lipofektamin Methode (siehe 3.3.2.) transfiziert. Zur Zellernte wurde das Kulturmedium der zuvor transfizierten Zellen abgegossen und die Zellkultur zweimal mit normalem Leitungswasser gespült. Anschließend wurden pro Well der 6-Well Kulturplatte 300 μ l Lysispuffer zugegeben und die Zellen für 20 Minuten auf einem Schüttler lysiert. Nach der Lyse wurden je 50 μ l eines Versuchsansatzes, mit den im Kit bereitgestellten Chemikalien im Luminometer vermessen. Der Versuch wurde in Doppelansätzen durchgeführt.

3.3.4. Matrigel Migrations- und Invasions-Assay (Boyden Kammer)

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit bzw. Invasivität von verschiedenen Zelllinien und Zellklonen diente der Matrigel Migrations- bzw. Invasions-Assay, der in speziellen Kammern, den Boydenkammern, durchgeführt wurde. Diese bestehen aus zwei Kompartimenten, die aufeinander geschraubt werden. Das untere Kompartiment der Kammer wurde zunächst mit 210 µl konditioniertem Medium befüllt. Zur Herstellung von konditioniertem Medium wurden konfluent wachsende Fibroblasten 24 h lang in Medium ohne FKS kultiviert, dieses Medium anschließend abgenommen, abzentrifugiert und für den Boydenkammer Versuch benutzt. Auf das konditionierte Medium im unteren Kompartiment wurde ein Filterpapier (Whatman International Ltd, Maidstone, England) mit einer Porengröße von 8 µm luftblasenfrei aufgelegt und der obere Aufsatz der Boydenkammer aufgeschraubt. Zur Analyse der Migration waren die Filter mit Gelatine beschichtet, für den Invasions-Versuch wurden zur Nachahmung der Basalmembran 52 µl Matrigel (1:3 verdünnt mit H₂O) auf den Filter pipettiert. Das Gel wurde zum Gelieren für 15-30 min bei 37°C inkubiert. Während des Gelierens wurden die jeweiligen Zelllinien bzw. Zellklone mit PBS gewaschen, mit Trypsin aus der Zellkulturschale abgelöst und anschließend gezählt. Die Zellen wurden dann in DMEM ohne FKS auf eine Zellzahl von 20.000 Zellen pro ml (Migrations-Versuch) bzw. 200.000 Zellen pro ml (Invasions-Versuch) eingestellt, je 800 µl auf den Filter in das obere Kompartiment der Boydenkammer gegeben und diese für vier Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Zellsuspension aus allen Kammern abgegossen, die Aufsätze abgeschraubt und die Filter herausgenommen. Die mit Matrigel beschichtete Oberseite der Filter wurde an einem, mit Wasser getränktem Papiertuch, vorsichtig abgewischt und in einen Färberahmen eingelegt. Die Filter wurden in einer Hemacolor Schnellfärbung fixiert und gefärbt, mit Leitungswasser gespült und mit der Unterseite nach oben auf Objektträger aufgelegt. Anschließend wurde die Anzahl der Zellen, die durch die Poren auf die Unterseite der Filter gewandert sind, im Mikroskop bestimmt.

3.3.5. Wundheilungstest

Zur Analyse der ungerichteten Migration von Melanomzellen und Zellklonen wurde ein Wundheilungstest (Scratch-Assay) durchgeführt. Hierfür wurden je ca. 250.000 Zellen/ well in eine 6 well-Zellkulturschale ausgesät, so dass sie konfluent waren. Es wurden dann mit Hilfe einer sterilen 1000 µl Pipettenspitze in den Zellrasen eines jeden Wells jeweils zwei gerade Furchen gezogen und an jeder Furche zwei Messpunkte auf der Unterseite der Platte

mit einem Stift markiert (Tag 0). Unter einem Mikroskop, wobei ein Okkular verwendet wurde, dass eine Messskala enthielt, wurde der Durchmesser der Furche bestimmt. Er lag meist zwischen 0,8 und 1,5 mm. Nach 24 h (Tag 1) wurde gemessen, wie weit sich die Furche an den markierten Messpunkten durch Migration der Zellen verengt hat. Die Messung wurde an zwei weiteren Tagen wiederholt (Tag 2 und Tag 3).

3.3.6. Proliferations-Assay

Das Zellwachstum von Melanomzelllinien und Zellklonen wurde mit Hilfe des XTT-Tests der Firma Roche, Mannheim, bestimmt. Hierfür wurden Zellen mit zwei unterschiedlichen Zellzahlen (1000 Zellen und 2000 Zellen/ well) in 96-well Zellkulturplatten in Dreifach-Ansätzen in vier Platten in DMEM-Nährmedium, welches kein Phenolrot enthielt, ausgesät und diese im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 Stunden wurde in das Medium einer Platte 50 µl XTT-Reagenz (XTT labeling reagent + electron-coupling reagent) pipettiert und diese für eine weitere Stunde in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurde im Photometer die OD bei 490 nm bestimmt. Eine zweite Messung mit dieser Platte wurde nach weiteren zwei Stunden Wachstum im Brutschrank durchgeführt. Nach zwei, drei bzw. vier Tagen wurden jeweils die anderen Platten ebenso vermessen.

3.4. Arbeiten mit *E. coli* und humanen mesenchymalen Stammzellen (HMSC)

3.4.1. Kultivierung von *E. coli*

Je nach Verwendungszweck erfolgte die Anzucht von *E. coli* auf Agarplatten bei 37°C im Brutschrank oder in LB-Medium bei 37°C auf Schüttler bei 250 rpm.

Zur Kultivierung und Isolation von transformierten Bakterien wurde dem LB-Nährmedium zusätzlich das Antibiotikum Ampicilin zur Selektion zugesetzt. Mit einer sterilen Spitze wurde von einer Agarplatte mit Kolonien von zuvor transformierten *E. coli* eine Einzelkolonie gepickt und mit dieser eine Flüssigkultur angeimpft.

3.4.2. Transformation von *E. coli*

Für die Transformation wurden zu 100 µl kompetenter *E. coli* Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, je 100 ng Plasmid-DNA zugegeben. Dieser Reaktionsansatz wurde 30 min auf Eis

inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen 45 sec bei 42°C einem Hitzeschock ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock wurden die Bakterien eine Minute auf Eis abgekühlt, pro Ansatz 500 µl LB-Medium hinzu gegeben und die Kultur für 60 min bei 37°C unter Schütteln wachsen gelassen. Die transformierten *E. coli* wurden dann 5 min bei 4000 rpm/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem selektierenden Medium mit dem Antibiotikum, für das ein Resistenzgen in der eingebrachten Plasmid-DNA vorlag. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

3.4.3. Differenzierung von humanen mesenchymalen Stammzellen zu Chondrozyten

In HMSC-Medium kultivierte Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, zentrifugiert und in Incomplete-Medium gezählt. Je 250.000 Zellen wurden in ein 15 ml Falcon-Spitzröhrchen gegeben und für 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert, so dass sich die Zellen in der Spitze des Röhrchen sammeln. Damit während der Kultivierung im Brutschrank der Gasaustausch gewährleistet ist, musste der Deckel halb aufgedreht werden. Die Röhrchen wurden dann für 24 h bei 37°C und 5 % CO₂ in den Brutschrank gestellt und durften während dieser Zeit nicht mehr bewegt werden, damit sich Pellets bilden konnten. Danach wurde das Incomplete Nährmedium, dem TGF-β3 zur Induktion der chondrozytären Differenzierung oder andere Stimulantien zugesetzt wurde, alle zwei bis drei Tage erneuert. Am Ende des Experimentes konnte die RNA der Pellets isoliert werden.

3.5. Statistik

Die Ergebnisse wurden als Mittelwert +/- Standardabweichung ausgedrückt. Durch den Student's paired t-test wurden einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Ein p-value < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen und mit einem Stern (*) markiert (*: p < 0,05, **: p < 0,01, ***: p < 0,001, ns: nicht signifikant). Alle Auswertungen der Experimente wurden mit dem Programm "GraphPad Prism" (GraphPad software Inc, San Diego, USA) durchgeführt.

III. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in zwei Publikationen veröffentlicht worden [210; 211]. Eine dritte Publikation über die Regulation von Zielgenen von AP-2 ϵ im Knorpel und in Osteoarthritis ist in Vorbereitung.

1. Integrin alpha10 im malignen Melanom

1.1. Die Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom ist erhöht

Mit Hilfe eines Affimetrix U133A Arrays wurde die Genexpression von 5 primären Kulturen von Melanozyten mit der Expression von 12 Zelllinien von primären Melanomen und 15 Zelllinien von Melanometastasen verglichen (Haass N.K. und Herlyn M., unveröffentlichte Daten). Dabei hat sich gezeigt, dass die Expression von *integrin alpha10* in 4 von 12 primären Melanomzelllinien und in 3 von 15 metastasierenden Melanomzelllinien im Vergleich zu Melanozyten stark erhöht ist.

Aufgrund dieser Hinweise wurde zunächst die Expression von Integrin alpha10 mRNA in sieben Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) mittels quantitativer Echtzeit PCR untersucht.

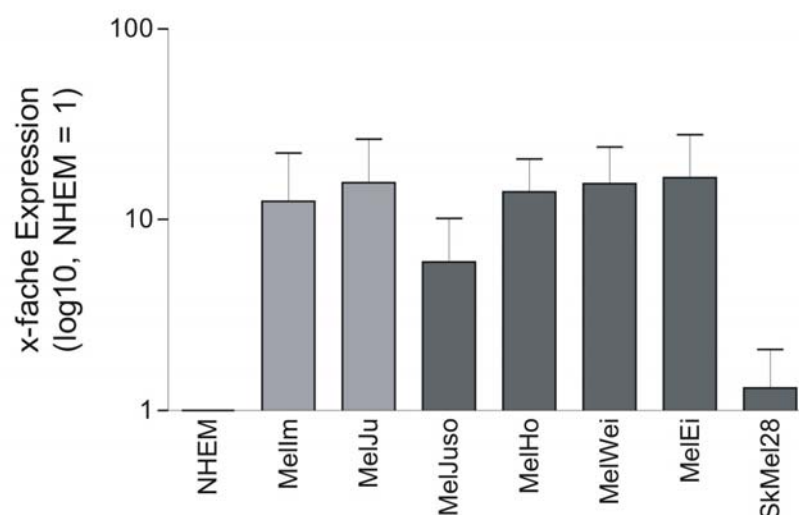


Abb 1A: mRNA Expression von Integrin alpha10. Quantifizierung der Integrin alpha10 mRNA mittels quantitativer Echtzeit PCR in sieben Melanomzelllinien verglichen mit primären Melanozyten. Melanomzelllinien aus einem Primärtumor sind dunkelgrau dargestellt, solche aus Metastasen in hellgrau.

Wie in Abbildung 1A deutlich zu erkennen ist, hat sich eine starke Induktion der Expression von Integrin alpha10 mRNA in allen untersuchten Melanomzelllinien, mit Ausnahme der Zelllinie SK Mel 28, im Vergleich zu NHEMs gezeigt (Abb 1A).

Um den Zeitpunkt der Expressionssteigerung von Integrin alpha10 mRNA im Verlauf der Melanomentwicklung feststellen zu können, wurde RNA analysiert, die durch Mikrodissektion aus zwei primären Melanomen, fünf Lymphknotenmetastasen und fünf Fernmetastasen isoliert wurde. Es konnte in allen untersuchten Primärtumoren, Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen eine gesteigerte Transkription von *integrin alpha10* im Vergleich zu Melanozyten ermittelt werden (Abb 1B).

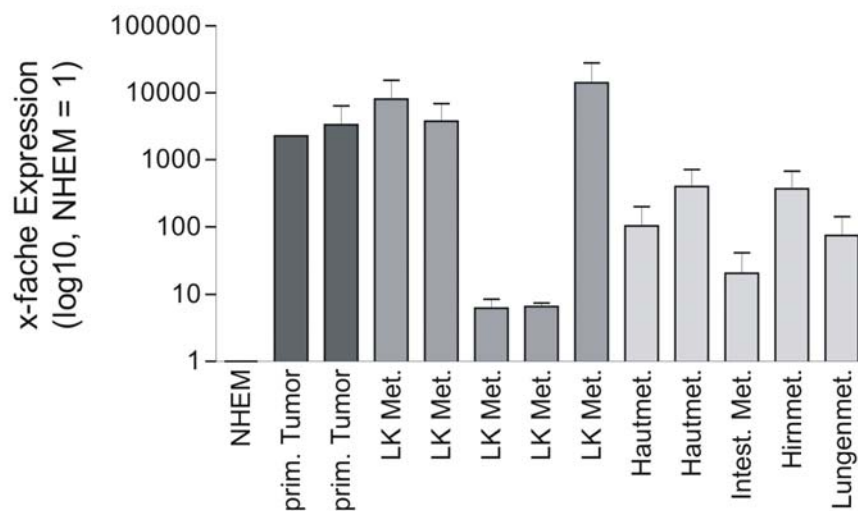


Abb 1B: Die mRNA Expression von Integrin alpha10 ist in Primärtumoren und Metastasen im Vergleich zu NHEMs deutlich erhöht. Analyse der Transkriptionsmenge von *integrin alpha10* *in vivo* in Primärtumoren, Metastasen und NHEMs mittels quantitativer Echtzeit PCR.

Auffällig war hierbei, dass die Expression von Integrin alpha10 *in vivo* in primären Melanomen und in Melanommetastasen um ein Vielfaches höher ist, als *in vitro* in den untersuchten Melanomzelllinien.

Als nächstes wurde die Proteinexpression von Integrin alpha10 in den sieben zuvor analysierten Melanomzelllinien mit Western Blot Experimenten untersucht, wobei ein spezifischer anti-Integrin alpha10 Antikörper verwendet wurde. Entsprechend der mRNA Expressionsdaten zeigten die Western Blot Experimente in allen Melanomzelllinien, mit

Ausnahme der Zelllinie SK Mel 28 und Mel Ju, eine verstärkte Proteinexpression von Integrin alpha10 im Vergleich zu NHEMs (Abb 1C).

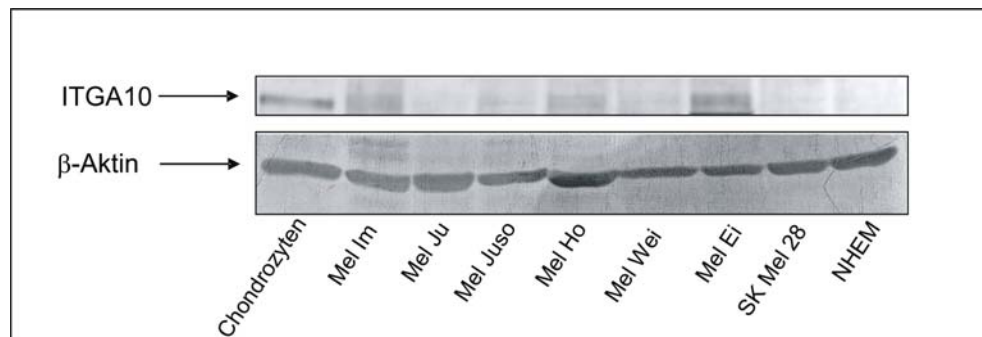


Abb 1C: Erhöhte Expression von Integrin alpha10 in Melanomzelllinien im Vergleich zu NHEMs. Je 40 µg Proteinlysate von den Melanomzelllinien Mel Im, Mel Ju, Mel Juso, Mel Ho, Mel Wei, Mel Ei und SK Mel 28 und von NHEM wurden im Western Blot mit einem spezifischen Antikörper gegen Integrin alpha10 analysiert. Als Positivkontrolle wurden 10 µg Proteinlysate von Chondrozyten aufgetragen. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

Die zusätzliche Färbung der Membran mit einem anti-β-Aktin Antikörper diente als Ladekontrolle für den Western Blot.

Zusätzlich zeigte die Untersuchung von Proteinextrakten, die aus der Membranfraktion, aus der zytoplasmatischen Fraktion und der Kernfraktion aus Zellen der Melanomzelllinie Mel Im isoliert wurden, dass Integrin alpha10 in Melanomzellen hauptsächlich in der Membran lokalisiert ist (Abb 1D).

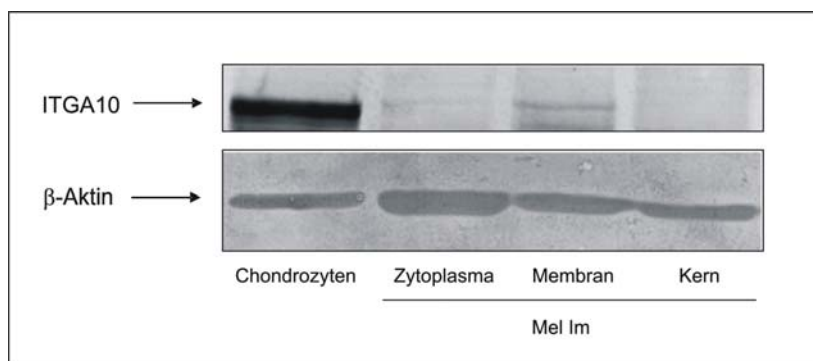


Abb 1D: Integrin alpha10 ist in der Zellmembran lokalisiert. Die Western Blot Analyse von je 40 µg Proteinlysate von Zytoplasma-, Membran- und Kernfraktionen von Mel Im Zellen zeigt deutlich eine Membranlokalisierung von Integrin alpha10. Als Positivkontrolle dienen 10 µg Proteinlysate von Chondrozyten. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

Um als nächstes die Proteinexpression von Integrin alpha10 *in vivo* zu untersuchen, wurden weitere Western Blots durchgeführt, wobei Proteinlysate verwendet wurden, die aus primären Melanomen und Melanommetastasen gewonnen wurden. Einhergehend mit den Analysen der quantitativen RT-PCR dieser Proben, konnte auch in den untersuchten Proteinextrakte Integrin alpha10 detektiert werden (Abb 1E). Die Expression in den untersuchten Metastasen ist im Vergleich zum Primärtumor noch verstärkt.

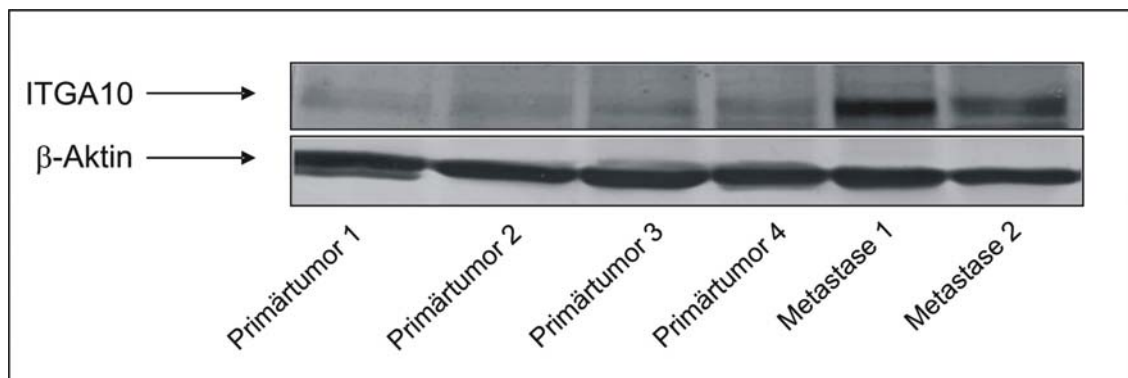


Abb 1E: Proteinexpression von Integrin alpha10 in vier Primärtumoren und zwei Metastasen. Je 40 µg Proteinlysate aus Geweben von Primärtumoren und Metastasen wurden mittels Western Blot auf die Expression von Integrin alpha10 mit einem spezifischen Antikörper untersucht. β-Aktin dient als Ladekontrolle.

Des Weiteren wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von malignen Melanomen von zehn Patienten durchgeführt. Wie in Abbildung 1F dargestellt ist, zeigten die Melanomzellen im Vergleich zu Zellen der Normalhaut eine positive Färbung.

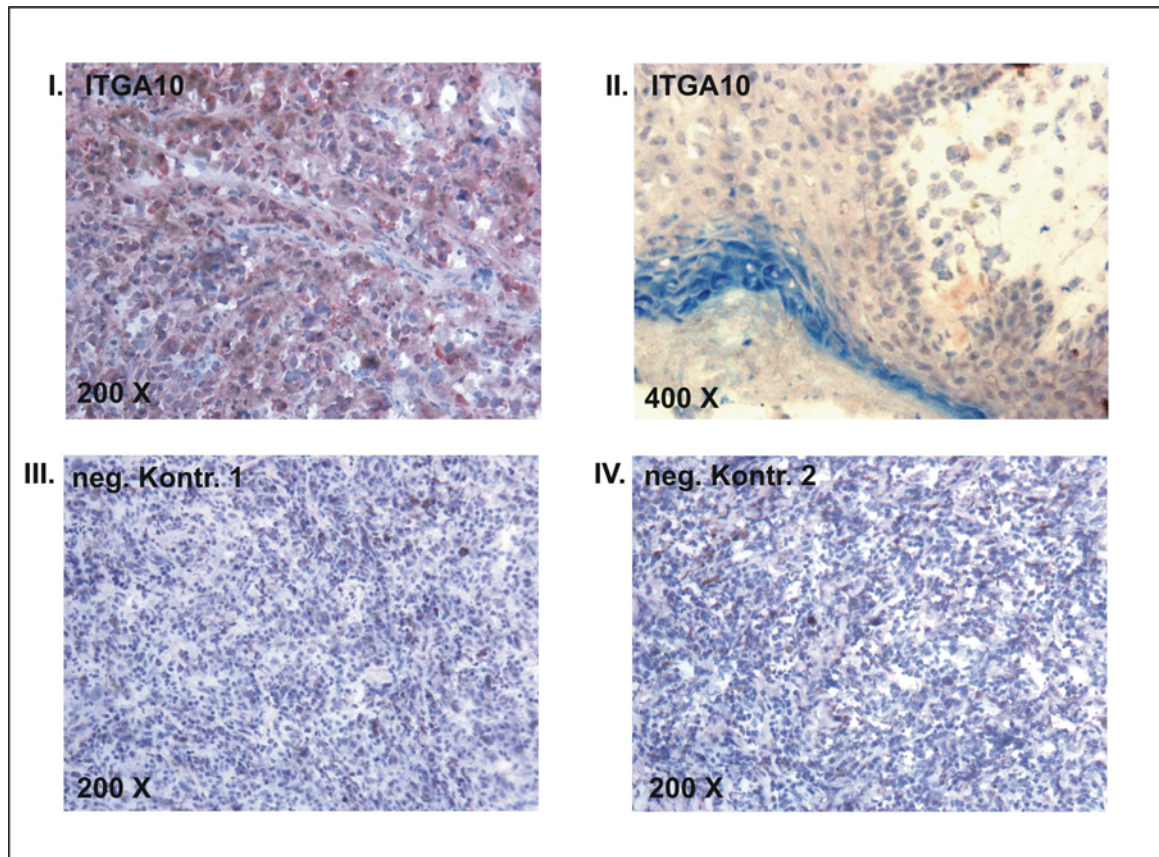


Abb 1F: Die immunhistochemische Färbung detektiert Integrin alpha10 im primären Melanom. (I) Integrin alpha10 färbt Gewebeschnitte von primärem Melanom (200fache Vergrößerung). Gewebeschnitte von Normalhaut (II) (400fache Vergrößerung) und Gewebeschnitte von primärem Melanom, die als Negativkontrolle mit Kaninchenserum (III) oder mit einem Isotyp-spezifischen IgG Antikörper (IV) gefärbt wurden (200fache Vergrößerung) zeigen keine Färbung.

Es konnte gezeigt werden, dass Integrin alpha10 im malignen Melanom im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) *in vitro* und *in vivo* verstärkt exprimiert wird.

1.2. Die Regulation der Transkription von *integrin alpha10* im malignen Melanom

Es sollte nun im Folgenden die Regulation der erhöhten Transkription von *integrin alpha10* im malignen Melanom näher untersucht werden.

Computergestützte Analysen der Promotorsequenz des *integrin alpha10* Promotors haben gezeigt, dass der Promotor drei Konsensusbindestellen für den Transkriptionsfaktor Ets-1 enthält. Zusätzlich konnten drei Bindestellen für AP-2 ermittelt werden. Die Ets-1

Bindestellen liegen zwischen -474 und -469 (Ets-1-III), -172 und -167 (Ets-1-II) und -125 und -120 (Ets-1-I) relativ zum Translationsstart. Bindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 befinden sich von -794 bis -786 (AP-2-III), -752 bis -745 (AP-2-II) und -161 bis -148 (AP-2-I) upstream vom ATG des *integrin alpha10* Promotors.

Zunächst wurde die Expression von Integrin alpha10 in AS-Ets-1-Zellklonen untersucht. Diese wurden mit einem antisense Expressionskonstrukt des Transkriptionsfaktors Ets-1 transient transfiziert, wodurch es zu einer Reduktion der Ets-1 Expression in der Zelle kommt. Es zeigte sich eine starke Abnahme der Expression von Integrin alpha10 in diesen Zellen, ähnlich der in NHEMs, im Vergleich zu untransfizierten Mel Im Zellen (Abb 2A).

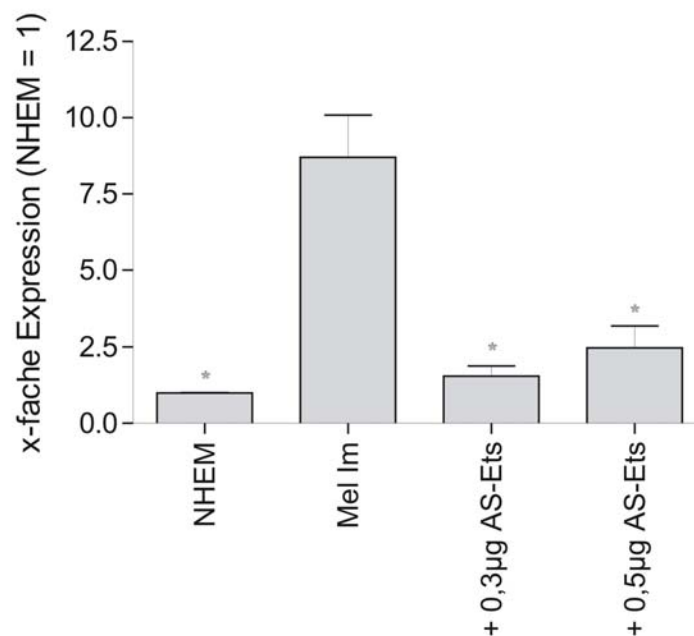


Abb 2A: Die Transkription von *integrin alpha10* in Melanomzellen mit reduzierter Ets-1 Expression ist deutlich erniedrigt. Nach transienter Transfektion von Mel Im Melanomzellen mit einem AS-Ets-1 Expressionskonstrukt ist die Expression von Integrin alpha10 mRNA stark reduziert, was mit Hilfe von quantitativer Echtzeit PCR ermittelt wurde. (*: $p < 0,05$).

Um zu zeigen, dass dieser Effekt spezifisch für Integrin alpha10 ist, wurde außerdem die Expression von Integrin alpha3 und Integrin alpha7b, zwei anderen, mit Integrin beta1 assoziierten Integrin-Untereinheiten, in diesen Melanomzellen mit reduzierter Ets-1 Expression untersucht. Es konnte jedoch kein Einfluss der reduzierten Ets-1 Expression auf Integrin alpha3 oder Integrin alpha7b festgestellt werden (Abb 2B).

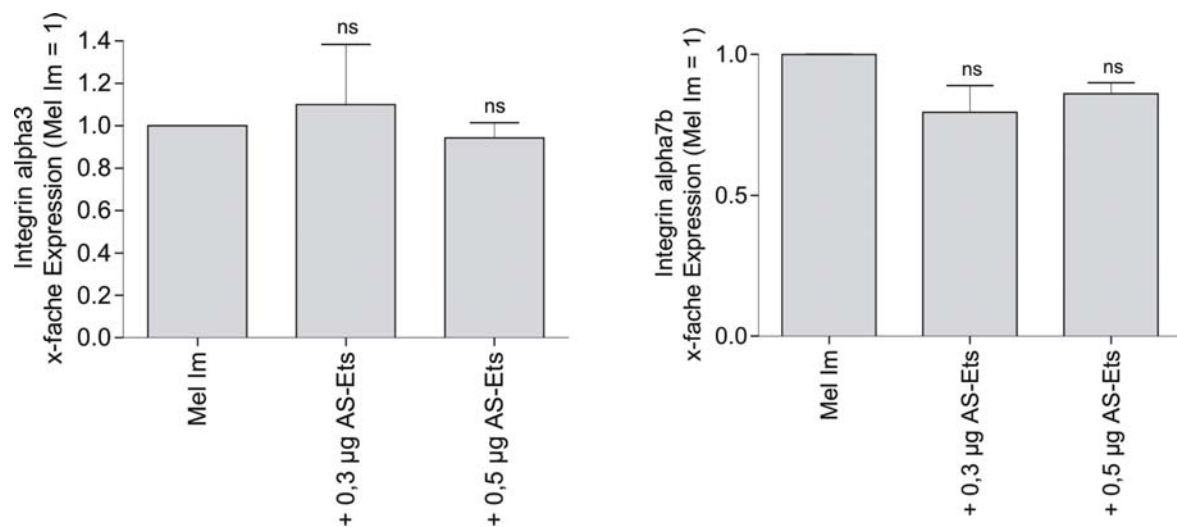


Abb 2B: Die mRNA Expression von Integrin alpha3 und Integrin alpha7b wird durch eine Verminderung der Ets-1 Expression nicht beeinflusst. Durch quantitative Echtzeit PCR wurde die mRNA Expression in Mel Im Zellen und Zellen, die mit einem AS-Ets-1 Expressionskonstrukt transient transfiziert wurden, ermittelt. (ns: nicht signifikant).

Um nun den Promotorbereich von *integrin alpha10* und die Regulation der Genexpression näher zu untersuchen, wurden 1139 bp der 5'-flankierenden Promotorsequenz, in der die drei Bindestellen für Ets-1 und für AP-2 enthalten sind, in das promotorlose Luziferase Reporterplasmid pGL3-basic kloniert (prom1139). Zusätzlich wurden zwei weitere Deletionskonstrukte des Promotors hergestellt (prom960 und prom350). Ein verkürztes Konstrukt (prom960) soll Aufschluss darüber geben, ob in dem Bereich zwischen -1139 bp und -960 bp upstream des Translationsstarts weitere regulatorische Einheiten (aktivierend oder reprimierend) lokalisiert sind, die die Transkription von *integrin alpha10* beeinflussen. Ein drittes Deletionskonstrukt (prom350) wurde um zwei AP-2 und um eine Ets-1 Bindestelle verkürzt. Abbildung 2C zeigt eine schematische Darstellung der drei Promotorkonstrukte mit den darin enthaltenen Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2.

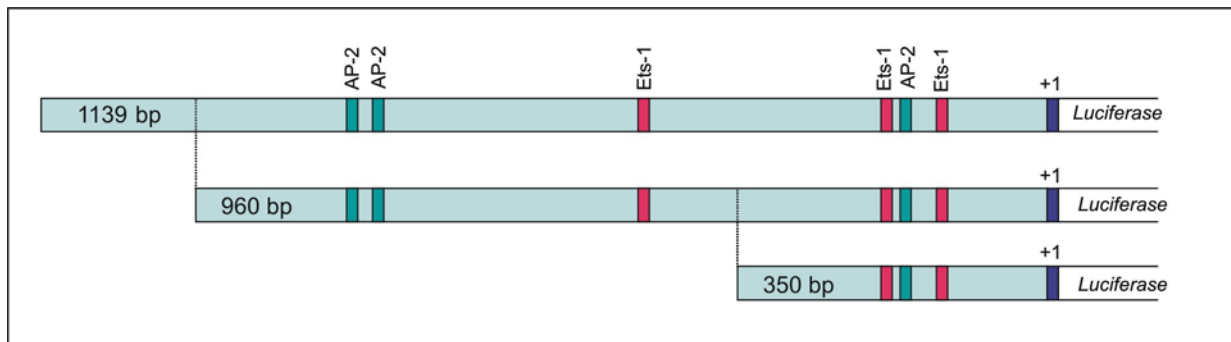


Abb 2C: Schematische Darstellung der drei *integrin alpha10* Promotorkonstrukte. Die drei Promotorkonstrukte enthalten Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2. Die Bindestellen für Ets-1 sind rot dargestellt, in grüner Farbe sind die Bindestellen für AP-2 eingezeichnet.

Nach transients Transfektion der Promotorkonstrukte in die Melanomzelllinie Mel Im wurde die Luziferaseaktivität bestimmt (Abb 2D).

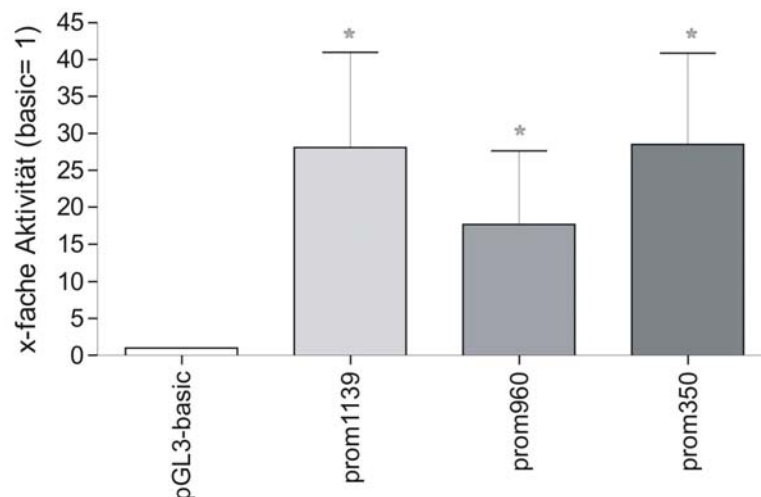


Abb 2D: Die drei Promotorfragmente prom1139, prom960 und prom350 von *integrin alpha10* sind in Melanomzellen aktiv. Die Luziferaseaktivitätsmessung zeigt, dass die Promotorkonstrukte in der Melanomzelllinie Mel Im im Vergleich zur Kontrolle eine bis zu 27 fache Erhöhung der Aktivität zeigen (*: $p < 0,05$).

Alle drei Konstrukte zeigen eine sehr stark erhöhte Luziferaseaktivität verglichen mit dem pGL3-basic Luziferasevektor allein, was bedeutet, dass schon die Promotorsequenz -350 bp

upstream des Translationsstarts von *integrin alpha10* alle regulatorischen Elemente enthält, die für die hohe Promotoraktivität von *integrin alpha10* in Melanomzellen nötig sind.

Um nun zu untersuchen, welchen Einfluss die Expression von Ets-1 auf die transkriptionelle Aktivität von *integrin alpha10* in Melanomzellen hat, wurde ein Expressionskonstrukt für Ets-1 in unterschiedlichen Konzentrationen zusammen mit je einem Promotorkonstrukt (prom1139, prom960, prom350) transient in die Melanomzelllinie Mel Im transfiziert und die Promotoraktivität bestimmt. Wie in Abbildung 2E deutlich zu erkennen ist, steigerte die zusätzliche Expression von Ets-1 die Aktivität des *integrin alpha10* Promotors um das bis zu 2,3 fache im Vergleich zur Aktivität des Promotorkonstrukts allein. Zusätzlich wurde die Promotoraktivität nach Transfektion mit einem AS-Ets-1 Expressionskonstrukt bestimmt. In diesem Fall wurde die Aktivität von allen drei Promotorkonstrukten stark reduziert (Abb 2E).

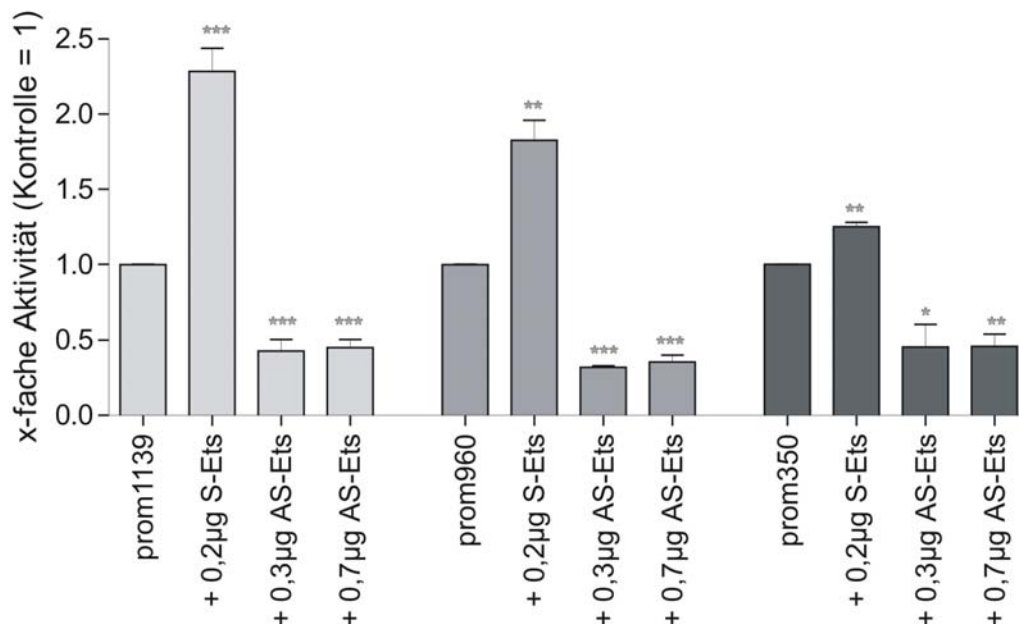


Abb 2E: Der Transkriptionsfaktor Ets-1 steigert die Aktivität des *integrin alpha10* Promotors. Nach transienter Transfektion von Ets-1 Expressionskonstrukten ist die Luziferaseaktivität der *integrin alpha10* Promotorkonstrukte im Vergleich zur Grundaktivität erhöht. Hemmung der Ets-1 Expression (AS-Ets) führt zu einer Abnahme der Promotoraktivität in allen drei Konstrukten (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

Um zu bestätigen, dass Ets-1 an den Promotor von *integrin alpha10* *in vivo* bindet, wurden Bindestudien mit Kernextrakt der Melanomzelllinie Mel Im und radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die die Ets-1 Bindesequenz (wt Ets-1) des *integrin alpha10* Promotors enthalten, durchgeführt. Abbildung 2F zeigt deutlich einen DNA-Protein Komplex (Spur 2), der durch unmarkierte Ets-1 Oligonukleotide verdrängt wurde (Spur 4). Im Gegensatz dazu

konnten unmarkierte Oligonukleotide, die eine mutierte Ets-1 Bindesequenz enthielten (mut Ets-1), den sich gebildeten DNA-Protein Komplex nicht verdrängen (Spur 3).

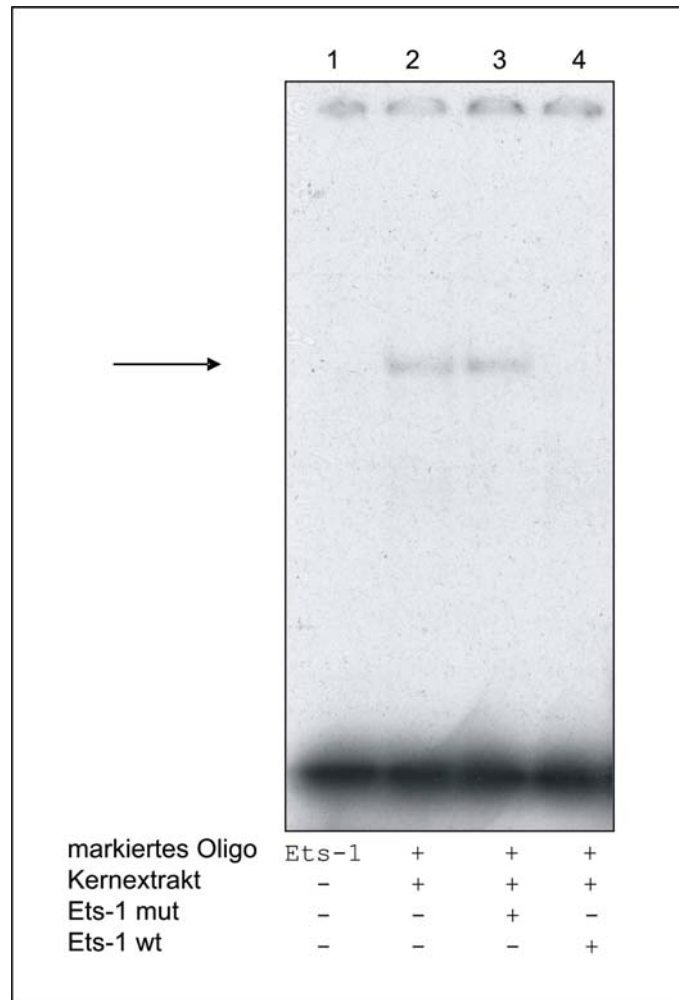


Abb 2F: Der Transkriptionsfaktor Ets-1 bindet an den Promotor von *integrin alpha10*, wie durch Gelretardationsexperimente bestätigt werden konnte. Kernextrakt von Mel Im Zellen bildet mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die die Sequenz der Ets-1 Bindestelle des *integrin alpha10* Promotors enthalten (Ets-1), einen Komplex (Spur 2), der sich durch unmarkierte Ets-1 wt Oligonukleotide verdrängen lässt (Spur 4), nicht aber durch Oligonukleotide, die eine mutierte Sequenz der Ets-1 Promotorbindestelle enthalten (Ets-1 mut, Spur 3).

Zusätzlich zu Bindestellen für Ets-1 wurden in der Promotorsequenz von *integrin alpha10* auch drei Konsensusbindestellen für den Transkriptionsfaktor AP-2 gefunden. Es ist zudem bekannt, dass der metastasierende Phänotyp des malignen Melanoms mit dem Verlust der AP-2 Expression korreliert [95; 96]. Aus diesem Grund wurde nun die Promotoraktivität des -1139 bp Promotorfragments von *integrin alpha10* nach Ko-Transfektion eines Expressionsplasmids für AP-2 α bestimmt. Wie aus Abbildung 2G ersichtlich ist, führte die

gesteigerte Expression von AP-2 α in der Melanomzelllinie Mel Im zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der *integrin alpha10* Promotoraktivität.

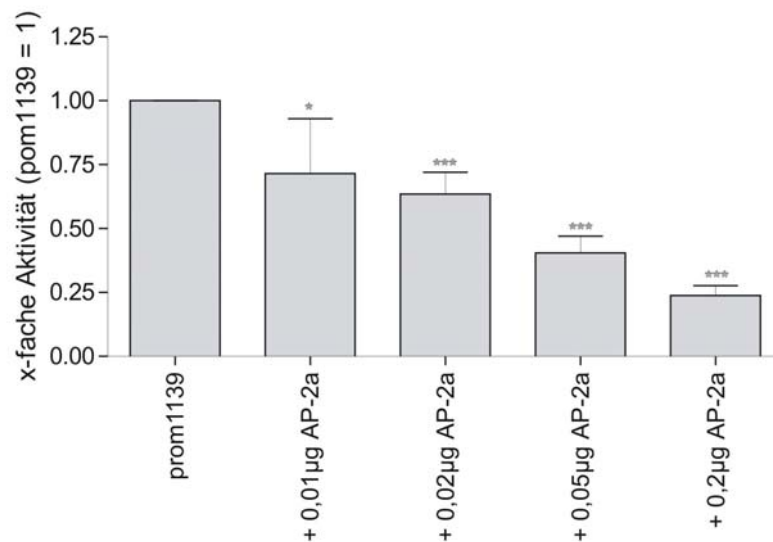


Abb 2G: Der Transkriptionsfaktor AP-2 α reprimiert konzentrationsabhängig die *integrin alpha10* Promotoraktivität. Die Luziferaseaktivität des Promotorkonstrukts prom1139 sinkt konzentrationsabhängig nach transienter Transfektion von 0,01 µg bis 0,2 µg eines AP-2 α Expressionskonstruktes (*: $p < 0,05$; ***: $p < 0,001$).

Es konnte also gezeigt werden, dass der Promotor von *integrin alpha10* Bindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 enthält und die Expression von Integrin alpha10 durch diese auch reguliert wird, wobei Ets-1 als ein Transkriptionsaktivator fungiert und AP-2 die Transkription konzentrationsabhängig hemmt.

1.3. Die funktionelle Relevanz von Integrin alpha10 im malignen Melanom

Um die funktionelle Rolle von Integrin alpha10 in der Progression des malignen Melanoms näher zu charakterisieren, wurden Zellklone generiert, die eine verminderte Expression von Integrin alpha10 aufwiesen. Hierfür wurden Zellen der Melanomzelllinie Mel Im stabil mit einem AS-Integrin alpha10 Expressionskonstrukt transfiziert, das eine zu *integrin alpha10* komplementäre Sequenz enthält, so dass es zu einer Bindung an die Integrin alpha10 mRNA und somit zu einem Abbau dieser doppelsträngigen mRNA Komplexe in der Zelle kommt.

Durch quantitative Echtzeit PCR wurden die AS-Integrin alpha10 Zellklone und die Kontrollzellklone auf die Reduktion der Integrin alpha10 mRNA Menge getestet (Abb 3A).

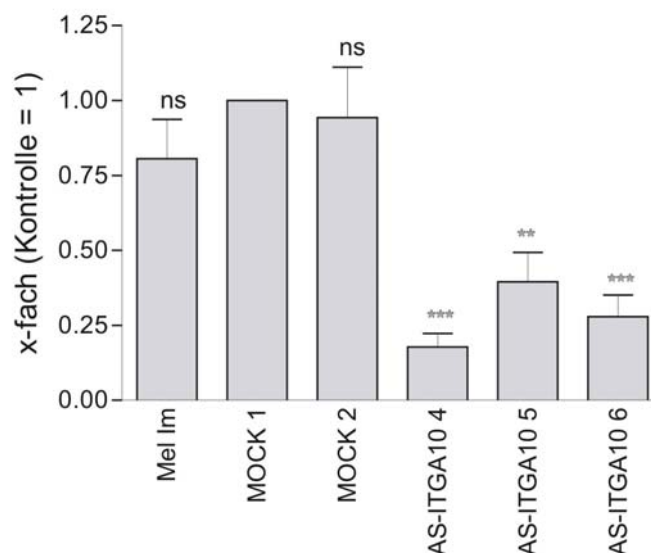


Abb 3A: Die mRNA Expression von Integrin alpha10 ist in den AS-Integrin alpha10 Zellklonen 4, 5 und 6 im Vergleich zur parentalen Zelllinie Mel Im und Kontrollzellklonen (mock 1 und 2) signifikant reduziert. In der Zelllinie Mel Im wurde mittels stabiler Transfektion mit einem antisense Expressionskonstrukt die Expression von Integrin alpha10 reduziert und diese Reduktion der Expression auf mRNA Ebene mittels quantitativer Echtzeit PCR analysiert (**: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$; ns: nicht signifikant).

Wie in Abbildung 3A zu sehen ist, transkribieren die AS-Integrin alpha10 Zellklone 4, 5 und 6 signifikant weniger *integrin alpha10* als die parentale Zelllinie Mel Im und die Kontrollzellklone mock 1 und mock 2.

Mit diesen AS-Integrin alpha10 Zellklonen und den Kontrollzellklonen wurden nun verschiedene funktionelle Tests durchgeführt, um die Rolle von Integrin alpha10 bei der Entstehung und Entwicklung des malignen Melanoms zu definieren. Die Analyse der Proliferation und Invasion der AS-Integrin alpha10-Zellklone haben keine signifikanten Unterschiede zu den Kontrollen gezeigt (Daten nicht gezeigt). Interessanterweise haben aber Untersuchungen der Migrationsfähigkeit der Zellklone mit verminderter Integrin alpha10 Expression ergeben, dass diese Zellklone auch eine signifikant verminderte Fähigkeit zur Migration im Vergleich zu einem nur mit einem Leervektor transfizierten Kontrollzellklon (mock) haben (Abb 3B).

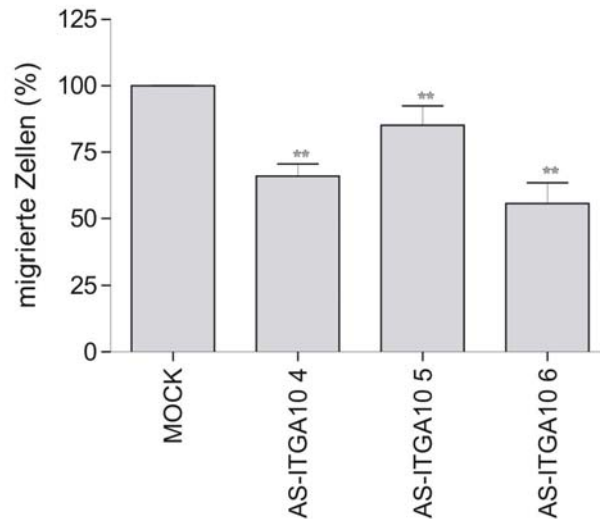


Abb 3B: Die AS-Integrin alpha10 Zellklone 4, 5 und 6 haben eine reduzierte Fähigkeit zur Migration. Migrationsexperimente, bei denen mit Gelatine beschichtete Filter im Boydenkammer System benutzt wurden, zeigen, dass von den AS-Integrin alpha10 Zellklonen signifikant weniger Zellen migrieren als Kontrollzellen, die mit einem Leervektor transfiziert wurden (mock) (**: $p < 0,005$).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurden die Migrationsexperimente mit untransfizierten Mel Im Zellen in Gegenwart eines inhibitorischen Antikörpers gegen Integrin alpha10, der die Funktion von Integrin alpha10 hemmt, wiederholt (Abb 3C).

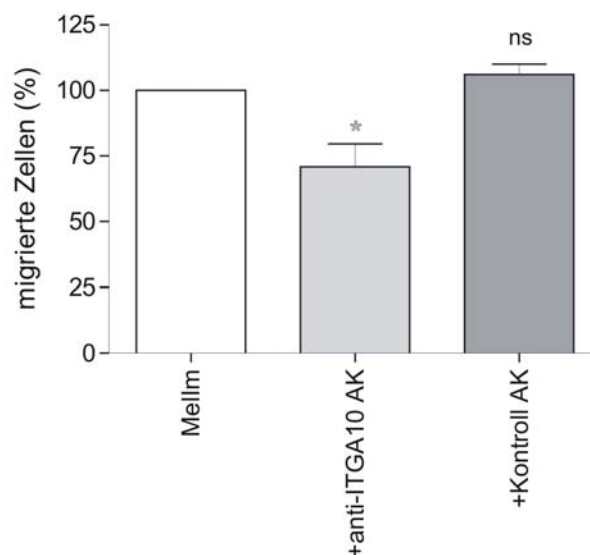


Abb 3C: Integrin alpha10 fördert die Migration von Mel Im Zellen. Die Inkubation von Zellen der Melanomzelllinie Mel Im mit einem inhibitorischen Antikörper gegen Integrin alpha10 führt zu einer Verminderung der Migrationsfähigkeit in Boydenkammerexperimenten im Vergleich zu unbehandelten Mel Im Zellen und Mel Im Zellen, die mit einem unspezifischen Kontrollantikörper behandelt wurden (*: $p < 0,05$; ns: nicht signifikant).

Als Kontrolle wurde ein unspezifischer IgG-Kontrollantikörper verwendet. Wie in Abbildung 3C zu erkennen ist, wurde durch Blockieren der Funktion von Integrin alpha10 auch die Migration der Melanomzellen, im Vergleich zu unbehandelten Zellen und Zellen, die mit einem Kontrollantikörper behandelt wurden, gehemmt.

Mit diesen zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen konnte gezeigt werden, dass Integrin alpha10 eine wichtige Funktion bei der verstärkten Migrationsfähigkeit von Melanomzellen während der Progression des malignen Melanoms hat.

Im ersten Teil dieser Arbeit ist die Rolle von Integrin alpha10 in der Entwicklung des malignen Melanoms untersucht worden. Es hat sich gezeigt, dass Integrin alpha10 im malignen Melanom im Vergleich zu NHEMs verstärkt exprimiert wird und dies die Migrationsfähigkeit der Melanomzellen fördert. Analysen zur Regulation haben ergeben, dass die Expressionssteigerung von Integrin alpha10 im malignen Melanom durch den Transkriptionsfaktor Ets-1 positiv reguliert wird. Der Transkriptionsfaktor AP-2, dessen eigene Expression im Verlauf der Melanomentstehung abnimmt, ist ein negativer Regulator von Integrin alpha10.

Da Integrin alpha10 zuerst in Chondrozyten identifiziert und beschrieben wurde [30; 31], jedoch keine Daten existieren, wie dessen Expression in Chondrozyten reguliert wird, sollte im Folgenden die Expression und die Regulation von Integrin alpha10 in Chondrozyten analysiert werden.

2. Integrin alpha10 in der Chondrogenese

2.1. Die Regulation der Transkription von *integrin alpha10* in Chondrozyten

Anhand des zuvor schon in Melanomzellen verwendeten 1139 bp Promotorkonstrukts wurde zunächst die Aktivität des *integrin alpha10* Promotors in primären Chondrozyten, Zellen der Chondrosarkomzelllinie SW1353 und, als Negativkontrolle, in Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 untersucht (Abb 4A).

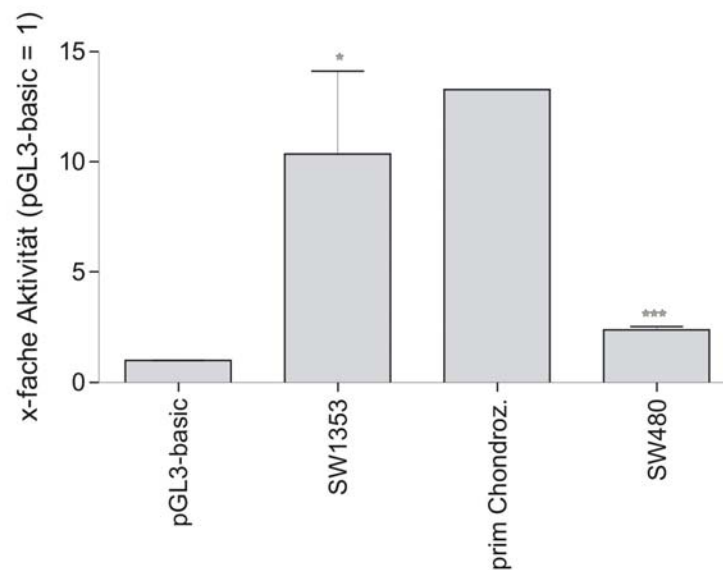


Abb 4A: Der Promotor von *integrin alpha10* ist in SW1353 und in primären Chondrozyten aktiv. Luziferaseaktivitätsmessungen von SW1353 Zellen, primären Chondrozyten und SW480 Zellen, die mit dem Promotorkonstrukt prom1139 des *integrin alpha10* Promotors transient transfiziert wurden, zeigen eine Aktivität des Promotors in SW1353 und primären Chondrozyten im Vergleich zu kontrolltransfizierten SW1353 Zellen (pGL3-basic) und Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 (*: $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

Wie in Abbildung 4A zu erkennen ist, generierte das Promotorkonstrukt, das 1139 bp der upstream Promotorsequenz von *integrin alpha10* enthält, eine hohe Luziferaseaktivität in SW1353 Chondrosarkomzellen und primären Chondrozyten. Im Vergleich dazu zeigten SW1353 Zellen, die mit dem Leervektor transfiziert wurden (pGL3-basic) und Zellen der Kolonkarzinomzelllinie SW480 nur eine sehr schwache Aktivität. Daraus lässt sich schließen, dass diese Promotorsequenz alle regulatorischen Einheiten enthält, die für eine Chondrozyten-spezifische Aktivität des *integrin alpha10* Promotors nötig sind.

Die folgenden Experimente wurden mit der humanen Chondrosarkomzelllinie SW1353 als Modellsystem für primäre Chondrozyten durchgeführt, weil die Transfektion primärer Chondrozyten nicht sehr effizient ist. SW1353 Zellen haben einen Knorpel-ähnlichen

Phänotyp und exprimieren knorpelspezifische Gene wie *col2a1*, *CD-RAP (MIA)*, *aggrecan* und auch *integrin alpha10* [210].

SW1353 Zellen wurden mit den drei Deletionskonstrukten prom1139, prom960 und prom350 des *integrin alpha10* Promotors (siehe 1.2.) transient transfiziert, um die Promotorelemente zu identifizieren, die für die Expression von Integrin alpha10 in Chondrozyten ausschlaggebend sind. Die Messung der Luziferaseaktivität ergab, dass alle drei Promotorfragmente in der Zelllinie SW1353 aktiv sind (Abb 4B). Die Promotoraktivität nahm mit zunehmender Länge der Fragmente bis hin zu einer 13,3 fachen Aktivität des längsten Promotorfragments im Vergleich zur Kontrolle zu.

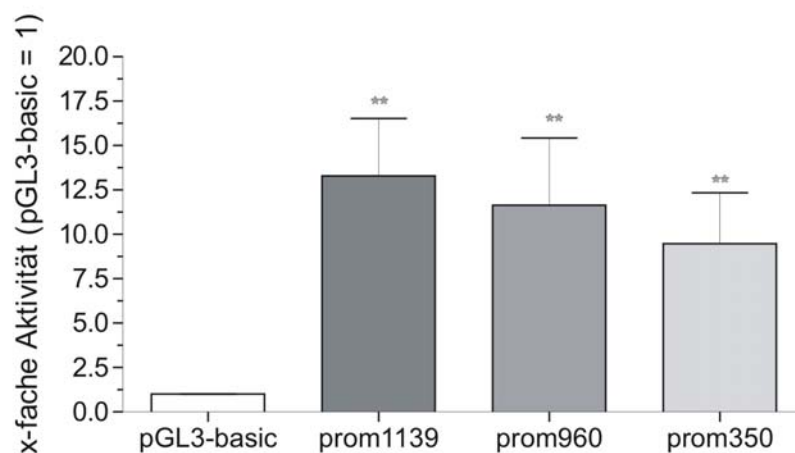


Abb 4B: Die *integrin alpha10* Promotorfragmente (prom1139, prom960 und prom350) sind in Zellen der Chondrosarkomzelllinie SW1353 aktiv. Nach transienter Transfektion der *integrin alpha10* Promotorfragmente prom1139, prom960 und prom350 in SW1353 zeigt die Messung der Luziferaseaktivität eine steigende Aktivität abhängig von der Fragmentlänge (**: $p < 0,005$).

Wie schon zuvor beschrieben, konnten in der Sequenz des *integrin alpha10* Promotors Konsensusbindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 identifiziert werden. Um den Einfluss der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 auf die Expression von Integrin alpha10 in Chondrozyten zu untersuchen, wurden SW1353 Zellen zusätzlich zu den Promotorkonstrukten mit Expressionskonstrukten für Ets-1 und AP-2 transient transfiziert und die Promotoraktivität bestimmt. Die Ko-Transfektion eines Ets-1 Expressionsplasmides mit den Promotorkonstrukten führte zu einer bis zu 4,7 fachen Steigerung der Aktivität des *integrin alpha10* Promotors verglichen mit der Aktivität von Zellen, die zur Kontrolle mit dem pGL3-basic Plasmid transfiziert wurden (Abb 4C).

Zusätzlich führte eine Hemmung der Ets-1 Expression durch die Transfektion mit einem AS-Ets-1 Expressionskonstrukt zu einer deutlichen Abnahme der Promotoraktivität bei allen drei Promotorkonstrukten.

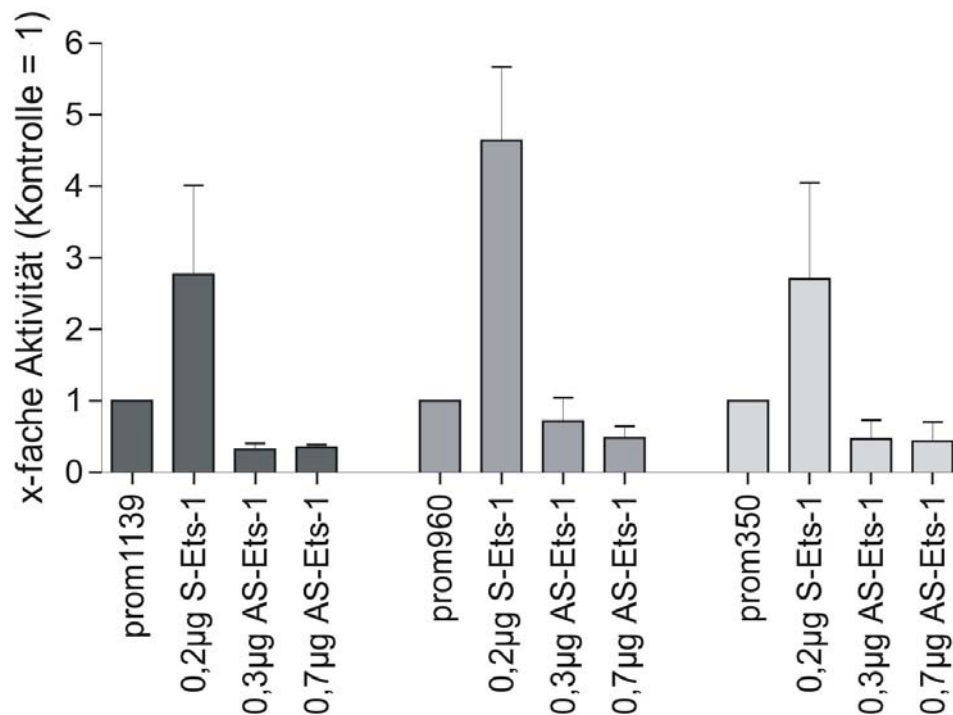


Abb 4C: Der Transkriptionsfaktor Ets-1 aktiviert den *integrin alpha10* Promotor. Die transiente Transfektion von SW1353 Zellen mit den *integrin alpha10* Promotorkonstrukten prom1139, prom960 und prom350 und einem Expressionsplasmid für Ets-1 (S-Ets-1) führt zu einer Steigerung der Luziferaseaktivität. Durch Ko-Transfektion mit einem AS-Ets-1 Expressionsplasmid (AS-Ets-1) kommt es zu einer Abnahme der Promotoraktivität.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass Ets-1 ein Aktivator des *integrin alpha10* Promotors ist, wurden nun der Einfluss des Transkriptionsfaktors AP-2 auf die Expression von Integrin alpha10 analysiert. Hierfür wurden Zellen der Chondrosarkomzelllinie SW1353 zusätzlich zu dem Promotorkonstrukt prom1139 mit einem Expressionskonstrukt für AP-2α transfiziert. In Abbildung 4D ist zu erkennen, dass AP-2 in niedrigen Konzentrationen (5 ng, 10 ng, 50 ng) zu einer Aktivierung des Promotorkonstruktes führt. In höheren Konzentrationen (100 ng, 200 ng) wurde die Promotoraktivität nicht beeinflusst, bzw. sogar leicht gehemmt (500 ng). Durch die Ko-Transfektion mit einem AS-AP-2 Expressionskonstrukt, die zu einer verminderten Expression von AP-2 in den SW1353 Zellen führte, wurde die Promotoraktivität gehemmt.

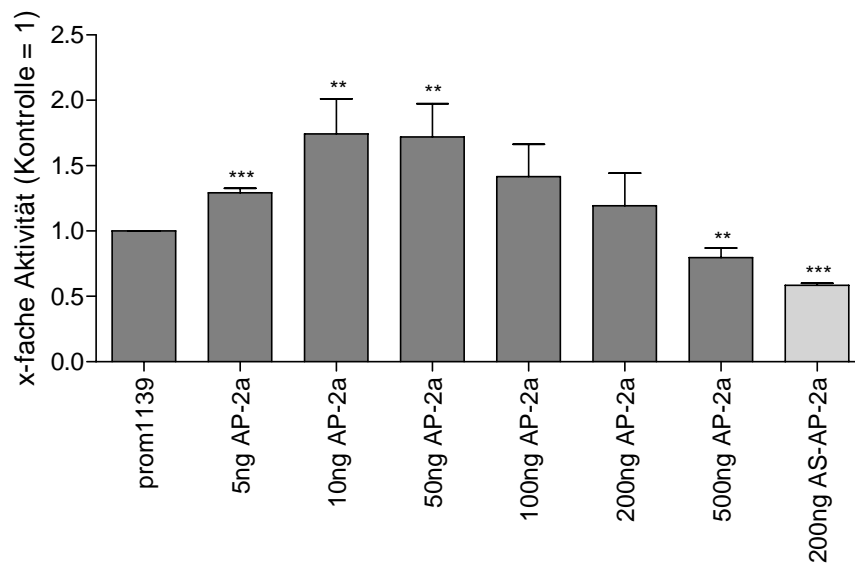


Abb 4D: Der Transkriptionsfaktor AP-2 steigert die *integrin alpha10* Promotoraktivität in SW1353 Zellen konzentrationsabhängig. Die transiente Transfektion von SW1353 Zellen mit dem prom1139 Promotorkonstrukt und einem Expressionskonstrukt für AP-2 führt in niedrigen Konzentrationen zu einer Steigerung der Luziferaseaktivität, in hohen Konzentrationen zu einer leichten Abnahme. Die Hemmung der AP-2 Expression durch ein AS-AP-2 Expressionskonstrukt führt zu einer Abnahme der Promotoraktivität von *integrin alpha10*. (**: $p < 0,005$; ***: $p < 0,001$)

Nachdem gezeigt werden konnte, dass AP-2 die Expression von Integrin alpha10 in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 in niedrigen Konzentrationen aktiviert, sollte nun die spezifische Bindung von AP-2 an den *integrin alpha10* Promotor *in vivo* gezeigt werden. Hierfür wurden Gelretardationsexperimente mit Kernextrakten von SW1353 und zwei radioaktiv markierten Oligonukleotiden (AP-2 I und AP-2 III) durchgeführt, die jeweils eine AP-2 Bindestelle in der Promotorsequenz des Integrin alpha10 Promotors umfassen (siehe Abb 2C). In Abbildung 4E ist zu erkennen, dass sich nach Inkubation des SW1353 Kernextraktes mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden, die zwei mögliche AP-2 Bindestellen im *integrin alpha10* Promotor umfassen, jeweils ein DNA-Protein-Komplex bildete (Spur 2 und Spur 6). Diese Komplexe konnten durch unmarkierte Oligonukleotide wieder verdrängt werden (Spur 3 und Spur 7). Auch die Inkubation mit einem unmarkierten Oligonukleotid, das eine optimale AP-2 Konsensusbindestelle (MTopt) enthält, führte zu einer Verdrängung der Komplexe (Spur 4 und Spur 8).

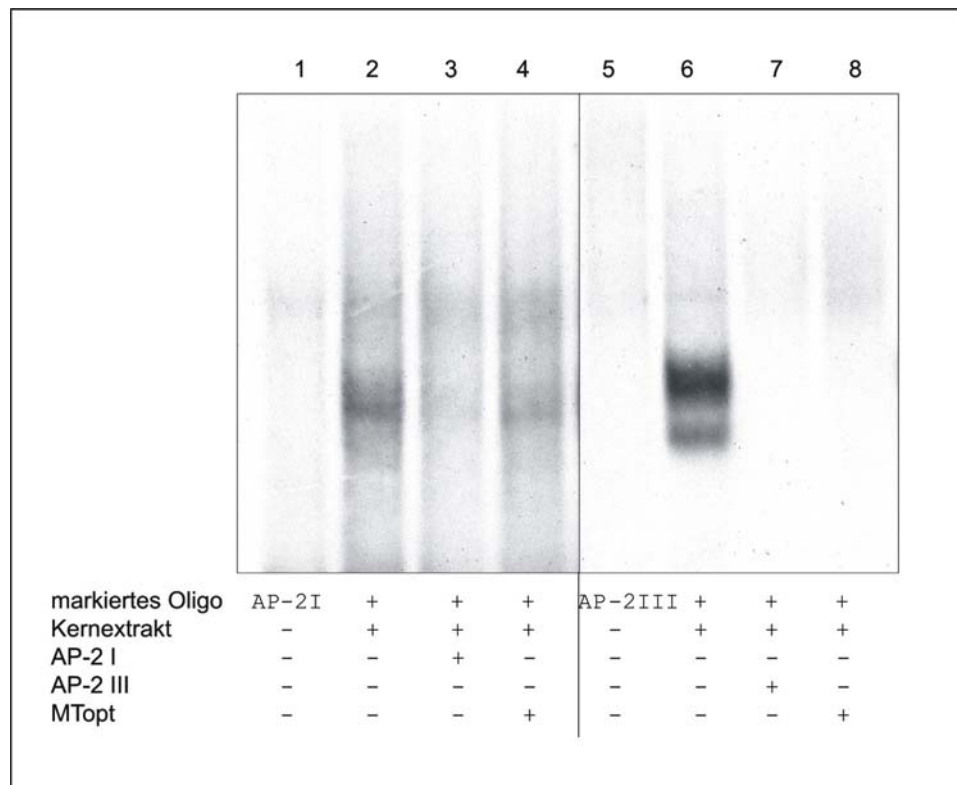


Abb 4E: Der Transkriptionsfaktor AP-2 bindet in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 an den Promotor von *integrin alpha10*. Gelretardationsexperiment mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden (AP-2 I und AP-2 III) mit der AP-2 Bindesequenz und 4µg Kernextrakt von SW1353 Zellen. Für die Verdrängungsstudien wurden unmarkierte Oligonukleotide AP-2 I und AP-2 III und Oligonukleotide mit der optimalen AP-2 Bindestelle in 400-fachem Überschuss eingesetzt.

Um zu bestätigen, dass die Bildung des DNA-Protein-Komplexes tatsächlich durch die Bindung des Transkriptionsfaktors AP-2 erfolgte, wurden die Gelretardationsexperimente mit einem Antikörper gegen AP-2 durchgeführt. Interessanterweise führte die zusätzliche Inkubation von Kernextrakt der Zelllinie SW1353 mit den radioaktiv markierten Oligonukleotiden AP-2 I und AP-2 III und einem Antikörper, der spezifisch gegen die AP-2 Isoformen α und β gerichtet ist, nicht zu einer Veränderung des Musters der DNA-Protein-Komplexe (Abb 4F, Spur 5 und Spur 10). Allerdings konnte durch Inkubation mit einem Antiserum gegen AP-2 ϵ gezeigt werden, dass es die Isoform AP-2 ϵ ist, die spezifisch an den Integrin α 10 Promotor bindet (Spur 4 und Spur 9). Der DNA-Protein-Komplex, der sich durch die Bindung von AP-2 ϵ an die Oligonukleotide AP-2 I und AP-2 III bildet, konnte durch Inkubation mit dem spezifischen anti-AP-2 ϵ -Antiserum zu einem Supershift retardiert werden.

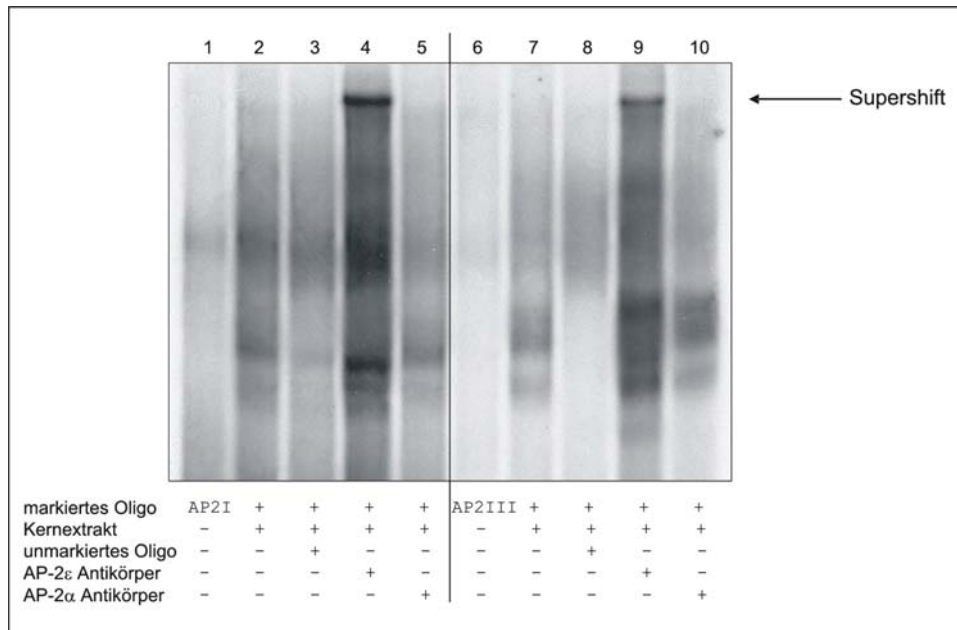


Abb 4F: Die Isoform AP-2ε bindet spezifisch an den Promotor von *integrin alpha10*. Gelretardationsexperiment mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden AP-2 I und AP-2 III, die die AP-2 Bindestelle im Integrin alpha10 Promotor umfassen, und 4µg Kernextrakt von SW1353 Zellen. Die Inkubation mit einem spezifischen anti-AP-2ε-Antiserum führt zur Bildung eines Supershift-DNA-Protein-Komplexes, gekennzeichnet durch einen Pfeil.

Da über die Expression des Transkriptionsfaktor AP-2ε in Knorpel bisher nichts bekannt war, wurden immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von Knorpel durchgeführt, um die Expression von AP-2ε in diesem Zelltyp *in vivo* zu bestätigen.

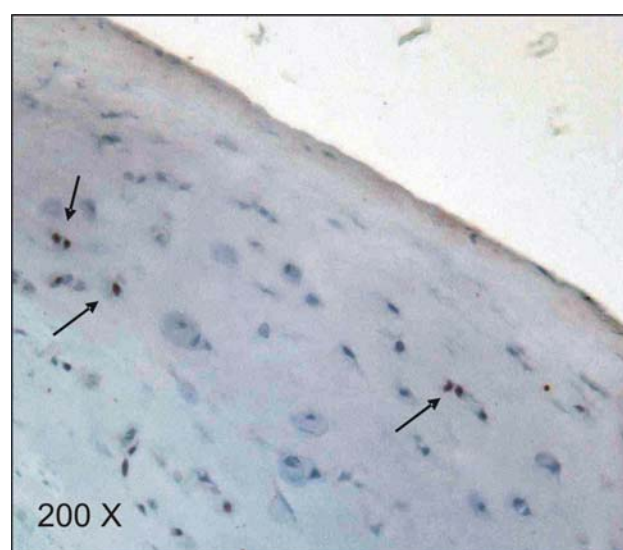


Abb 4G: Der Transkriptionsfaktor AP-2ε wird in Normalknorpel exprimiert. Immunhistochemische Färbung an Gewebeschnitten von Normalknorpel mit einem spezifischen anti-AP-2ε-Antiserum. Durch schwarze Pfeile sind positiv gefärbte Chondrozyten gekennzeichnet.

Wie in Abbildung 4G zu erkennen ist, führte die Färbung mit einem spezifischen anti-AP-2 ϵ -Antiserum zu einer stark positiven Färbung der Chondrozyten in Normalknorpel.

Damit ist bestätigt worden, dass auch der Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ in Chondrozyten *in vivo* exprimiert wird, wobei die Funktion allerdings nach wie vor unklar bleibt.

2.2. Die Rolle von AP-2 ϵ in der Differenzierung von Chondrozyten

Da bekannt ist, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 α ein Regulator der Chondrozytendifferenzierung ist, sollte nun untersucht werden, ob eventuell auch AP-2 ϵ für die Differenzierung von Bedeutung ist. In humanen differenzierten Chondrozyten, dedifferenzierten Chondrozyten und humanen mesenchymalen Stammzellen (HMSC), in denen durch Stimulierung mit TGF- β 3 eine chondrozytäre bzw. mit BMP-2 eine osteogene Differenzierung ausgelöst wurde, wurde die Expression von AP-2 ϵ analysiert. Wie in Abbildung 5A deutlich zu erkennen ist, wird AP-2 ϵ in humanen differenzierten Chondrozyten verstärkt exprimiert. Auch in HMSC, die durch TGF- β 3 Stimulierung zu Chondrozyten differenziert sind, ist die Expression von AP-2 ϵ verstärkt. Eine osteogene Differenzierung führte allerdings nicht zu einer Induktion der AP-2 ϵ Expression.

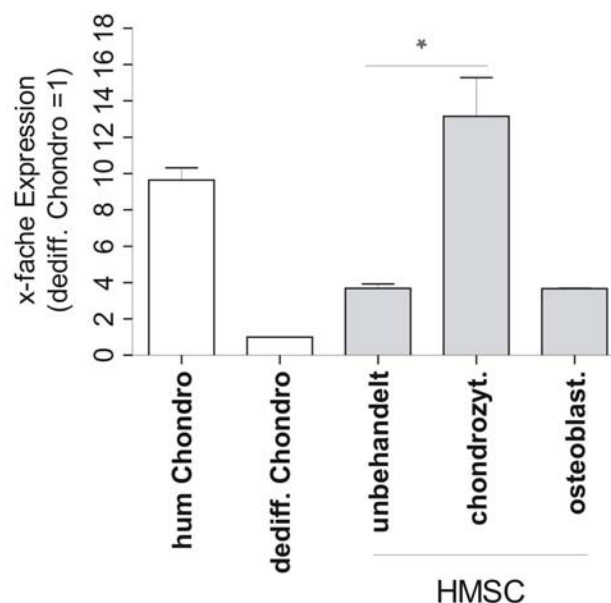


Abb 5A: Der Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ wird in humanen mesenchymalen Stammzellen, in denen eine chondrogene Differenzierung induziert wurde, exprimiert. Quantitative RT-PCR Analyse der Expression von AP-2 ϵ in humanen Chondrozyten, dedifferenzierten Chondrozyten und HMSC, die mit TGF- β 3 bzw. BMP-2 stimuliert wurden.

Da gezeigt werden konnte, dass AP-2 ϵ im Rahmen der Differenzierung von Chondrozyten eine Rolle spielt, wurden weitere Expressionsanalysen mit HMSC durchgeführt, in denen durch Stimulierung eine chondrozytäre Differenzierung ausgelöst wurde. Um näher eingrenzen zu können, wann im Verlauf der Differenzierung die Expression von AP-2 ϵ induziert wird, wurde die Expression in einem Zeitverlauf untersucht, bei dem über 40 Tage während der Differenzierung die RNA von Zellen analysiert wurde. Wie in Abbildung 5B zu erkennen ist, ist die Expression von AP-2 ϵ bereits zu Beginn der Differenzierung induziert, steigt aber erst ab Tag 17 deutlich an. Dies lässt vermuten, dass AP-2 ϵ erst im späteren Verlauf der Knorpelentwicklung eine Rolle spielt.

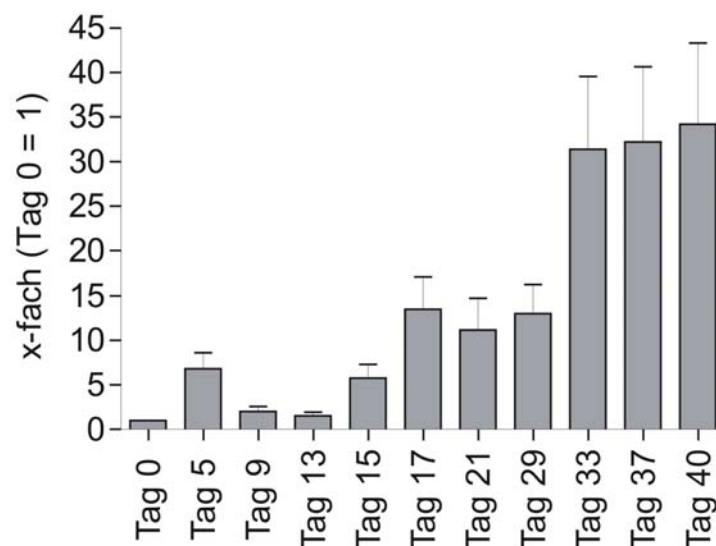


Abb 5B: Die Expression von AP-2 ϵ steigt erst spät im Verlauf der Differenzierung an. Analyse der Expression von AP-2 ϵ in HMSC, die mit TGF- β 3 stimuliert wurden, über 40 Tage mittels quantitativer Echtzeit-PCR.

2.3. AP-2 ϵ ist in Chondrozyten von Osteoarthritispatienten verstärkt exprimiert

Es ist bekannt, dass viele Moleküle, die an der Differenzierung der Chondrozyten beteiligt sind, darunter auch viele Transkriptionsfaktoren, in Knorpelerkrankungen wie der Osteoarthritis (OA) fehlreguliert sind. Um dadurch mögliche Hinweise auf die Funktion von AP-2 ϵ im Rahmen der Chondrozytendifferenzierung zu erhalten, wurde die Expression von AP-2 ϵ in Chondrozyten von Osteoarthritispatienten mit der in differenzierten Chondrozyten verglichen. Erstaunlicherweise kommt es in Chondrozyten von OA-Patienten zu einer vielfachen Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors (Abb 5C). Auch die Expression

von Integrin alpha10, dem Zielgen des Regulators AP-2 ϵ ist in OA-Chondrozyten, verglichen mit normalen differenzierten Chondrozyten und Zellen der Chondrosarkomzelllinie SW1353 verstärkt (Abb 5D).

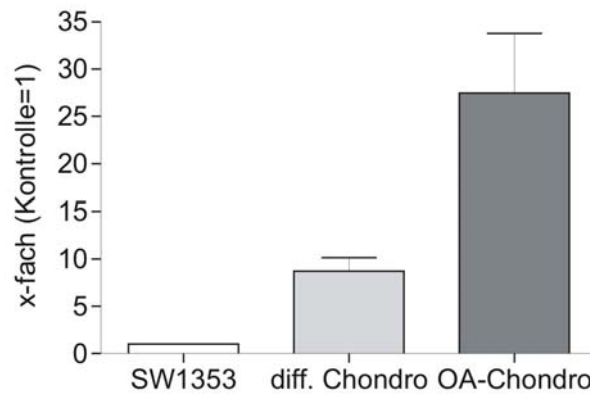


Abb. 5C: Die Expression des Transkriptionsfaktors AP-2 ϵ ist in OA-Chondrozyten verstärkt. Quantitative Expressionsanalyse von AP-2 ϵ in Chondrozyten von Osteoarthritis-Patienten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten und SW1353 Zellen. n = 5.

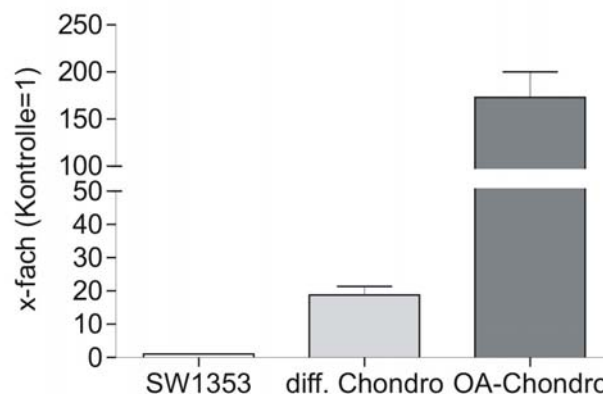


Abb. 5D: Die Expression von Integrin alpha10 ist in OA-Chondrozyten verstärkt. Quantitative Expressionsanalyse von Integrin alpha10 in Chondrozyten von Osteoarthritispatienten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten und SW1353 Zellen. n = 5.

Zur Bestätigung, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ auch *in vivo* exprimiert wird, wurden immunhistochemische Färbungen an Knorpelgewebeschnitten von Osteoarthritispatienten angefertigt. Wie in Abbildung 5E zu erkennen ist, sind in Knorpelgewebe von OA-Patienten Chondrozyten AP-2 ϵ positiv gefärbt. Es fällt auf, dass im Vergleich zur Analyse von gesundem Knorpel in OA-Gewebe wesentlich mehr Zellen positiv gefärbt sind (siehe Abb. 4G).

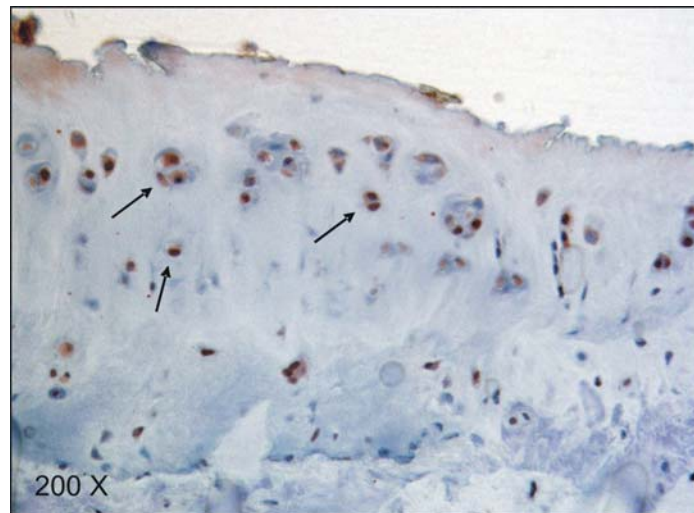


Abb. 5E: AP-2 ϵ wird in OA-Chondrozyten exprimiert. Immunhistochemische Färbung von Knorpelgewebe von OA-Patienten mit einem spezifischen anti-AP-2 ϵ -Antiserum. Positiv gefärbte Chondrozyten sind mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet.

Insgesamt deuten diese Analysen darauf hin, dass AP-2 ϵ ein Transkriptionsfaktor ist, der in der Osteoarthritis-Erkrankung eine wichtige Rolle spielt und möglicherweise, neben Integrin alpha10, noch weitere Zielgene reguliert, die an der Entwicklung dieser Krankheit beteiligt sind.

2.4. Identifizierung von weiteren Zielgenen, die durch AP-2 ϵ reguliert werden

Zur Identifikation von weiteren Zielgenen von AP-2 ϵ wurde eine Chromatin-Immunpräzipitation mit einem anschließenden Promotor-Array mit OA-Chondrozyten durchgeführt. Da zuvor gezeigt werden konnte, dass AP-2 ϵ in diesen Zellen verstärkt exprimiert wird, ist somit die Bindung an die Promotorbereiche in diesem Zellsystem deutlicher zu erkennen.

Mit einem spezifischen anti-AP-2 ϵ Antikörper wurden zunächst diejenigen Promotorbereiche der DNA isoliert, an die AP-2 ϵ *in vivo* bindet (+AK-Ansatz). Als Kontrolle diente ein Ansatz, bei dem kein Antikörper verwendet wurde (–AK-Ansatz). Die Proben wurden dann mittels PCR amplifiziert, um genügend Probenmaterial zur Hybridisierung auf den Array zu haben. Zur Überprüfung der Amplifikation wurde als Positivkontrolle eine quantitative RT-PCR mit Primern spezifisch für den Promotorbereich für *integrin alpha10* mit der Input-DNA, dem +AK-Ansatz und dem -AK-Ansatz durchgeführt. In vorherigen Experimenten konnte ja

bereits nachgewiesen werden, dass AP-2 ϵ *in vivo* an den Promotor von *integrin alpha10* bindet (siehe 2.1.).

Um genomweit nach AP-2 ϵ regulierten Genen suchen zu können, wurden die immunpräzipitierten DNA-Fragmente des +AK-Ansatzes und des –AK-Ansatzes auf jeweils einen GeneChip® Human Promoter 1.0R Array hybridisiert, die von 25.000 humanen Genen die Promotorbereiche als Sonden auf dem Chip enthielten. Diese Arbeit wurde vom Kompetenzzentrum für Fluoreszente Bioanalytik (KFB) in Regensburg durchgeführt.

Zur Auswertung der Arraydaten wurden zunächst mit der “Tiling Analysis Software“ (TAS) bestimmte Formate generiert, die anschließend im “Integrated Genome Browser“ (IGB) visualisiert und gefiltert wurden. Auf diese Weise konnten die durch den Array erhaltenen signifikanten Signale des –AK-Ansatzes (unspezifischer Hintergrund) mit denen des +AK-Ansatzes verglichen und so die Gene ermittelt werden, an deren Promotor AP-2 ϵ in OA-Chondrozyten signifikant bindet. Es konnten insgesamt 94 potentielle, durch den Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ regulierte Gene identifiziert werden.

Zur detaillierten Analyse dieser Gene wurden diese zunächst ihrer Funktion entsprechend in Gruppen eingeordnet. Die Einteilung erfolgte nach verschiedenen Kriterien, wie der Beteiligung an biochemischen oder metabolischen Prozessen oder der Zugehörigkeit zu Gengruppen. In der Abbildung 6A ist die funktionelle Einteilung der Zielgene als Diagramm dargestellt.

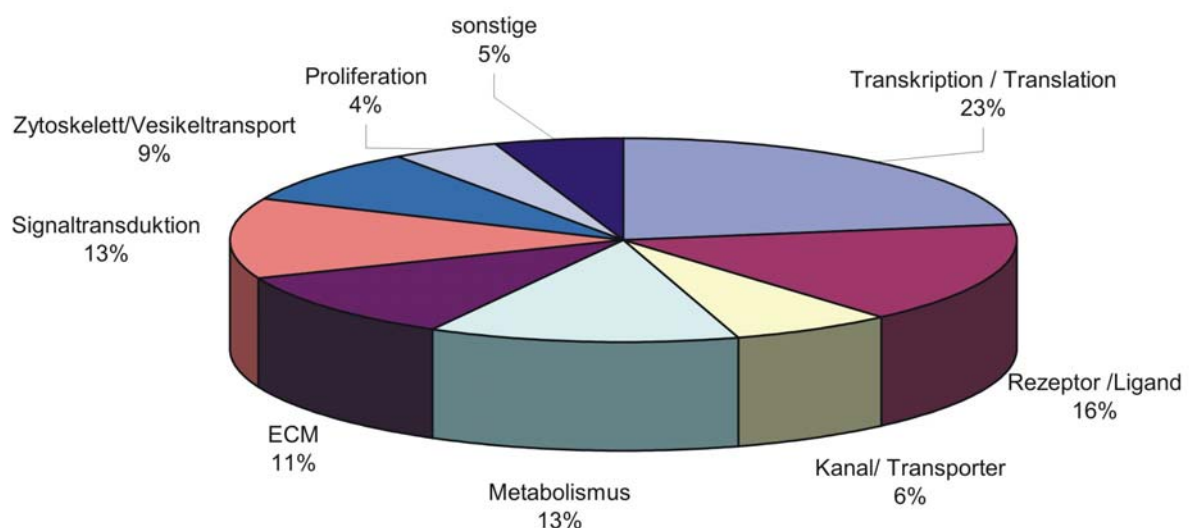


Abb 6A: Graphische Darstellung der Einteilung der durch AP-2 ϵ regulierten Gene in funktionelle Gruppen. Die Gene, die nach Auswertung des Promotorarrays als Ergebnis erhalten wurden, wurden auf Grund ihrer Funktion in folgende Gruppen eingeteilt: Transkription/ Translation, Rezeptor/ Ligand, Kanal/ Transporter, Metabolismus, ECM, Signaltransduktion, Zytoskelett/ Vesikeltransport, Proliferation und sonstige.

Die meisten Gene (23 %), die durch den Array als potentielle Zielgene von AP-2 ϵ identifiziert wurden, sind an Transkriptions- und Translationvorgängen beteiligt. Außerdem sind unter den Genen auch 16 % Rezeptoren oder Liganden und 13 % Signalmoleküle.

Es wurde nun begonnen, zunächst die Expression einer kleinen Auswahl an Genen zu bestätigen und diese näher zu charakterisieren, von denen bereits bekannt ist, dass sie in Chondrozyten exprimiert werden und in Osteoarthritis eine Rolle spielen. Es sind dabei drei Transkriptionsfaktoren, zwei Gene aus der Gruppe Rezeptor/ Ligand und drei Signalmoleküle ausgewählt worden. Von diesen acht Genen wurde als erstes die quantitative Expression in OA-Chondrozyten von fünf verschiedenen Patienten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten mittels RT-PCR bestimmt. Eine Übersicht über die analysierten Gene und die Expression in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten ist in Tabelle 1 dargestellt.

<i>Gennamen</i>	<i>Symbol</i>	<i>x-fache Expression</i>
Transkription/ Translation		
paired-like homeodomain 1	Pitx1	0,422
runt-related transcription factor 1	Runx1	4,532
SRY (sex determining region Y)-box 5	Sox5	8,284
Rezeptor/ Ligand		
chemokine (C-X-C-motif) ligand 1	CXCL1	62,264
transforming growth factor, beta3	TGF β 3	3,387
Signaltransduktion		
regulator of G-protein signaling 3	RGS3	4,116
regulator of G-protein signaling 12	RGS12	4,434
Smad family member 7	Smad7	5,59

Tabelle1: Übersicht über acht Gene, an deren Promotor AP-2 ϵ in OA-Chondrozyten bindet. Dargestellt sind der Gennamen, das Gensymbol und die x-fache Expression in OA-Chondrozyten (n=5) im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten.

Wie in der Tabelle zu erkennen ist, ist die Expression aller untersuchten Gene in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten differentiell reguliert. Mit Ausnahme von *pitx1*, das in OA-Chondrozyten vermindert reguliert wird, sind alle übrigen Gene in OA-Chondrozyten, verglichen mit differenzierten Chondrozyten, verstärkt exprimiert.

In weiterführenden Arbeiten ist nun geplant, die Arrayergebnisse für die oben genannten Gene *pitx1*, *runx1*, *sox5*, *CXCL1*, *TGFβ3*, *RGS3*, *RGS12* und *smad7* zu bestätigen, indem die Expression dieser Gene in Chondrozyten untersucht werden soll, die mit einem Expressionskonstrukt für den Transkriptionsfaktor AP-2ε transfiziert werden. Zusätzlich sollen durch Western Blot Analysen und immunhistochemische Färbungen von Gewebeschnitten die Proteinexpression in OA-Chondrozyten analysiert werden. Außerdem soll versucht werden, durch funktionelle Analysen die Funktion der Regulation dieser Gene durch den Transkriptionsfaktor AP-2ε aufzuklären, um damit möglicherweise zum Verständnis der Entwicklung einer Osteoarthritis beitragen zu können.

IV. Diskussion

1. Integrin alpha10 im malignen Melanom

1.1. Die Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom untersucht. Da Arraydaten auf eine verstärkte Expression von Integrin alpha10 im Melanom hingewiesen haben, sollte die Hypothese bestätigt werden, dass Integrin alpha10 eine Rolle in der Pathogenese des Melanoms spielt. Insbesondere stellte sich die Frage, ob die Expression von Integrin alpha10 während der Melanomentwicklung und -progression verändert ist und ob eine Fehlregulation der Expression mit den Eigenschaften des Tumors korreliert. Zusätzlich sollte untersucht werden, durch welche Faktoren die Expression von Integrin alpha10 reguliert wird.

Analysen der mRNA Expression von Integrin alpha10 in sieben Melanomzelllinien haben gezeigt, dass die Expression in sechs der untersuchten Melanomzelllinien im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) stark induziert ist. Die Melanomzelllinie SkMel28 zeigt nur eine schwache Induktion der Expression von Integrin alpha10. Durch weitere *in vivo* Expressionsanalysen mit RNA von Primärtumoren und Metastasen konnte gezeigt werden, dass *integrin alpha10* bereits im Primärtumor verstärkt transkribiert wird. Dies konnte auf Proteinebene durch Western Blot Analysen bestätigt werden. Eine Ausnahme bildeten die Zelllinien SKMel28 und Mel Ju, die nur eine sehr schwache Expression aufwiesen. Da sich dies für die Zelllinie SKMel28 auch auf RNA-Ebene zeigte, obwohl auch diese Zellen aus einem metastasierenden Melanom isoliert worden sind und somit aggressive Zellen sind, ist zu vermuten, dass Integrin alpha10 nicht in allen Melanomen von Patienten zur Entwicklung eines aggressiven Tumors beiträgt. In der Zelllinie Mel Ju könnte die Proteinmenge von Integrin alpha10 möglicherweise aufgrund post-transkriptioneller Regulationsmechanismen reduziert sein. Eine Möglichkeit für eine solche Regulation wäre die mRNA Stabilität. Dabei wird die mRNA von *integrin alpha10* im Zellkern gebildet, diese jedoch vor Beginn der Translation bereits wieder abgebaut, so dass kein Protein nachweisbar ist.

Schließlich konnte auch eine sehr hohe Proteinexpression von Integrin alpha10 *in situ* in Primärtumoren und Metastasen nachgewiesen werden. Interessanterweise erweist sich die Expression von Integrin alpha10 hier höher als in den Melanomzelllinien, die in Zellkultur gehalten werden. Es ist möglich, dass die Interaktion der Tumorzellen mit der Umgebung, die

in der Zellkultur nicht gegeben ist, die Expression von Integrin alpha10 in den Melanomzellen *in vivo* noch zusätzlich verstärkt.

1.2. Die Regulation der Transkription von *integrin alpha10* im malignen Melanom

Des Weiteren ist die Regulation der Expression von Integrin alpha10 untersucht worden. Dabei hat sich gezeigt, dass diese durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 kontrolliert wird. Von den beiden Transkriptionsfaktoren ist bereits bekannt, dass sie zur Progression des malignen Melanoms beitragen [55; 95].

Ets-1 spielt eine wichtige Rolle in der Differenzierung, Proliferation, Angiogenese, Apoptose und in der Tumervaskularisation und -invasion [55; 212]. Der Transkriptionsfaktor Ets-1 fördert die Angiogenese, indem er die Expression von Integrin beta3 und von einigen Proteasen, die für die frühen Schritte der Bildung von neuen Blutgefäßen notwendig sind, induziert [213; 214]. In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass durch Inhibierung von Ets-1 durch eine Antisense-Strategie oder durch Verwendung eines dominant negativen Moleküls die Angiogenese gehemmt wird [214-216]. Etliche Gene, die durch Ets-1 reguliert werden, wie *uPA* (urokinase type of plasminogen activator), Matrixmetalloproteinasen (*MMPs*), *BMP4* und auch *integrin beta3*, sind mit einem invasiven Phänotyp assoziiert.

Während der Embryogenese wird die Ets-1 Expression in epithelialen Strukturen, während der Ausbreitung der Somiten in die mesenchymalen Sklerotome und während der Wanderung der Neuralleistenzellen, von denen die Melanozyten abstammen, vorübergehend induziert [217]. Schließlich konnte nachgewiesen werden, dass Ets-1 auch eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des malignen Melanoms spielt [55], denn die verstärkte Expression von Ets-1 trägt zum malignen Phänotyp des Melanoms bei.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass der Promotor von *integrin alpha10* potentielle Bindestellen für den Transkriptionsfaktor Ets-1 enthält. Es wurde zudem bestätigt, dass Ets-1 an den Promotor von *integrin alpha10 in vivo* bindet und die Expression von Integrin alpha10 in Melanomzellen spezifisch aktiviert. Andere Integrine, die ebenfalls im malignen Melanom verstärkt exprimiert werden, wie Integrin alpha3 und Integrin alpha7b [70], werden nicht durch Ets-1 reguliert.

Auch der Transkriptionsfaktor AP-2 (activating enhancer-binding protein-2) spielt eine wichtige Rolle bei der Progression des malignen Melanoms [95]. Der Verlust von AP-2 ist mit dem Übergang der Melanomzellen von der radialen in die vertikale Wachstumsphase verbunden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass nicht-metastatische Melanomzelllinien AP-2 verstärkt exprimieren, während hochgradig metastatische Melanomzelllinien keine Expression von AP-2 mehr aufweisen [98; 102; 218]. Diese Erkenntnisse werden durch *in vivo* Studien an Gewebeproben von Melanompatienten bestätigt [96; 219]. Auf Grund dieser Daten gilt AP-2 daher als ein Tumorsuppressor. Der Verlust von AP-2 wird als ein wichtiges molekulares Ereignis in der Melanomentwicklung angesehen, welches in der veränderten Regulation von AP-2 Zielgenen, die zum Tumorwachstum und zur Metastasierung des Tumors führt, resultiert. Zum Beispiel führt der Verlust von AP-2 in metastatischen Melanomzellen zu einer Überexpression von MCAM/MUC18 (melanoma cell adhesion molecule) und BMP4 und einer verminderten Expression von c-KIT, einem Tyrosin Kinase Rezeptor [98; 99; 220].

Im Hinblick auf Integrin alpha10 konnte in dieser Arbeit eine funktionelle Rolle von AP-2 als Transkriptionsrepressor gezeigt werden. AP-2 hemmt die Expression von Integrin alpha10 in Melanomzellen. Einhergehend mit dem Verlust von AP-2 während der Progression des malignen Melanoms steigt die Expression von Integrin alpha10 und trägt zur Entwicklung des metastatischen Phänotyps des Melanoms bei. Auch für andere Integrine konnte bereits eine Regulation durch AP-2 gezeigt werden. Eine Array-profiling Studie hat ergeben, dass auch die Integrine alpha5 und alpha7 und beta3 und beta5 in humanen A375P Melanomzellen durch AP-2 reguliert werden [103]. Dabei wurde allerdings nicht beschrieben, ob AP-2 als positiver oder als negativer Regulator fungiert.

1.3. Die Funktion von Integrin alpha10 im malignen Melanom

Zusätzlich zur Transkriptionsregulation wurde in weiteren Analysen auch die Funktion der gesteigerten Expression von Integrin alpha10 im malignen Melanom untersucht. Funktionelle Tests mit Melanomzellen, die kein Integrin alpha10 mehr exprimieren, haben gezeigt, dass Integrin alpha10 einen Einfluss auf die gerichtete Migration der Melanomzellen hat. Eine verminderte Integrin alpha10 Expression oder die Inkubation der Melanomzellen mit einem inhibitorischen Antikörper gegen Integrin alpha10 hemmt die Migration der Melanomzellen *in vitro*. Ein positiver Einfluss eines Integrins auf die gerichtete Bewegung im Verlauf der

Melanomentwicklung wird auch durch Analysen von Aznavoorian und Kollegen bestätigt [221]. In dieser Studie führte die Blockierung von Integrin α 5 β 3 mit einem inhibitorischen Antikörper zur Hemmung des chemotaktischen Verhaltens der Melanomzellen. Möglicherweise hat Integrin α 10 eine ähnliche Funktion wie Integrin α 5 β 3 und interagiert mit entsprechenden Liganden, wodurch die gerichtete Migration beeinflusst wird.

Weitere funktionelle Analysen haben ergeben, dass die Proliferation, das Matrix-unabhängige Wachstum und das Invasionspotential der Melanomzellen nicht beeinflusst werden. Das Ausbleiben von Effekten auf diese Vorgänge, bedingt durch die Reduktion der Integrin α 10 Expression, lässt sich mit Redundanz zwischen Integrinen erklären. Andere Integrine könnten möglicherweise die Funktion von Integrin α 10 übernehmen. Eine ähnliche Redundanz der Integrin Expression ist für andere Kollagen-bindende β 1 Integrine in Chondrozyten beschrieben worden [33]. Zum Beispiel zeigen die Wachstumsfugen von Mäusen, die kein Integrin α 10 mehr exprimieren können, weniger schwere Abnormalitäten verglichen mit Wachstumsfugen, denen Integrin β 1 fehlt. Dieser Effekt wird auf Redundanz zurückgeführt. Es wird angenommen, dass die Funktionen von Integrin α 10 hauptsächlich von dem Kollagen-bindenden Integrin α 1 β 1 übernommen wird [33]. Die Expression von Integrin α 10 im malignen Melanom, die in dieser Arbeit untersucht wurde und die redundant erscheint, scheint mit den Ergebnissen in Chondrozyten vergleichbar. Da Melanomzellen auch den Integrin α 10 Rezeptor Kollagen Typ II exprimieren [211], wäre es möglich, dass hier ein anderes Kollagen Typ II bindendes Integrin, wie Integrin α 1 β 1, Integrin α 2 β 1 oder Integrin α 11 β 1 [30; 222; 223] die Rolle von Integrin α 10 übernimmt.

Es wird angenommen, dass die gerichtete Bewegung der Melanomzellen essentiell für die zelluläre Ausbreitung des Tumors ist. Die Induktion der Expression von Integrin α 10, die bereits ein frühes Ereignis in der Tumorentwicklung ist und schon im Primärtumor stattfindet, führt zu der Annahme, dass Integrin α 10 *in vivo* die lokale Ausbreitung des Tumors und das Einwandern der Tumorzellen in die Dermis fördern könnte. Aus diesem Grund trägt die positive Regulation der Expression von Integrin α 10 im malignen Melanom zur Entwicklung und Progression des Tumors bei.

2. Integrin alpha10 in der Chondrogenese

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde die Expression von Integrin alpha10 in Chondrozyten untersucht. Da Integrin alpha10 als ein Kollagen Typ II-bindendes Integrin in Chondrozyten bereits beschrieben worden ist, sollte nun dessen Regulation näher untersucht werden.

2.1. Die Regulation der Transkription von *integrin alpha10* in Chondrozyten

Wie sich herausgestellt hat, wird Integrin alpha10 auch im Knorpel durch die zwei Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 reguliert. Dabei aktiviert Ets-1 in Chondrozyten, wie auch im malignen Melanom, die Transkription von *integrin alpha10*. Von anderen Faktoren der Ets-Familie wurde bereits beschrieben, dass sie eine wichtige Rolle als Transkriptionsregulatoren in der Knorpelentwicklung spielen. Zum Beispiel konnte gezeigt werden, dass der Transkriptionsfaktor ERG (ets related gene) und eine alternative Splicevariante C-1-1 als Regulator für die Knorpelentwicklung wichtig sind [224; 225]. Über die Rolle von Ets-1 in der Differenzierung von Chondrozyten ist bisher noch nichts bekannt. In weiterführenden Analysen wäre es interessant zu untersuchen, ob nicht auch ERG die Expression von Integrin alpha10 regulieren kann.

Neben Ets-1 wird die Expression von Integrin alpha10 noch durch den Transkriptionsfaktor AP-2 reguliert. AP-2 spielt in der Differenzierung der Chondrozyten und der Skelettentwicklung eine große Rolle. Räumlich und zeitlich begrenzte Expressionsmuster von AP-2 wurden in verschiedenen embryonalen Geweben, in Zelllinien von bestimmten Neuralleistenzellen und in mesenchymalen Extremitätenknospen während der Entwicklungsphase detektiert [226].

Durch vorangehende Studien mit Deletionskonstrukten des *integrin alpha10* Promotors konnte ein Promotorfragment identifiziert werden (-1139 bp), dass drei Bindemotive für AP-2 enthält und dadurch zu einer hohen Promotoraktivität, speziell in Chondrozyten, führt. Zudem ist die Regulation der Transkription von *integrin alpha10* durch AP-2 konzentrationsabhängig. In niedrigen Konzentrationen führte AP-2 zu einer Aktivierung des Promotors, wohingegen hohe Konzentrationen die Promotoraktivität hemmen. Dieser biphasische Effekt von AP-2 wird als „Squelching“ bezeichnet und wurde zuvor auch schon für andere Gene beschrieben, die durch AP-2 reguliert werden, wie zum Beispiel für *IG-FBP-5* (insulin-like growth factor binding protein-5) oder auch für *CD-RAP (MIA)* [206; 227].

Es ist ebenfalls bekannt, dass AP-2 sowohl als Aktivator als auch als Repressor die Transkription von Zielgenen regulieren kann. Diese doppelte Funktion von AP-2 hat sich auch für die Regulation von Integrin $\alpha 10$ bestätigt. Im malignen Melanom hemmt AP-2 die Transkription von *integrin alpha10*, wohingegen AP-2 in Chondrozyten Integrin $\alpha 10$ aktiviert.

Mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten konnten zwei der drei potentiellen Bindestellen (AP-2-I und AP-2-III) im *integrin alpha10* Promotor bestätigt werden. Durch Generieren eines Supershifts wurde AP-2 ϵ als das Mitglied der AP-2-Familie identifiziert, das an den Promotor von *integrin alpha10* bindet. Über die Expression von AP-2 ϵ im Knorpel war bisher allerdings noch nichts bekannt, weshalb im Zuge dieser Arbeit der Aspekt genauer untersucht wurde.

2.2. Die Rolle von AP-2 ϵ in der Differenzierung von Chondrozyten

Es konnte gezeigt werden, dass AP-2 ϵ in Chondrozyten, in der Chondrosarkomzelllinie SW1353 und auch *in vivo* im Knorpel exprimiert wird. Da bisher nur eine Lokalisation von AP-2 ϵ in der Haut und im zentralen Nervensystem bekannt war [79; 80; 228], sind nun noch weitere Analysen notwendig, um die hier neu gewonnenen Expressionsdaten zu stützen. Man könnte zum Beispiel immunhistochemische Färbungen an Gewebeschnitten von Mausembryonen durchführen, um die genaue Lokalisation von AP-2 ϵ im Knorpel auffinden zu können.

Zur Ermittlung der Induktion von AP-2 ϵ im Verlauf der Knorpelentwicklung wurde die Expression von AP-2 ϵ in einer Reihe von chondrogen differenzierten humanen mesenchymalen Stammzellen (HMSC) über 40 Tage analysiert. Dabei hat sich gezeigt, dass die Expression von AP-2 ϵ erst spät im Verlauf der Differenzierung ansteigt. In den späten Differenzierungsstadien von Chondrozyten kommt es zur Bildung des hypertrophen Knorpels. In diesen unteren Knorpelschichten ist die Sauerstoffkonzentration im Knorpel sehr gering. Während Chondrozyten in den äußeren Knorpelschichten 6 bis 10 % Sauerstoff ausgesetzt sind, sind in den tieferen Schichten nur noch 1 bis 6 % Sauerstoff nachzuweisen [229-232]. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der Expression von AP-2 ϵ und der Differenzierung der Chondrozyten zu hypertrophem Knorpel. Das hier verwendete Modell der Stammzelldifferenzierung lässt sich allerdings nur bedingt auf die *in vivo* Situation in der Knorpelentwicklung übertragen, da nicht eindeutig ist, auf welche Entwicklungsstadien die

einzelnen Zeitpunkte zu übertragen sind. Auch um diese Fragestellung klären zu können, wären immunhistochemische Studien an verschiedenen Entwicklungsstadien von Embryonen hilfreich.

Die Funktion von AP-2 ϵ in Chondrozyten ist noch unbekannt. Dagegen ist AP-2 α als ein weiteres Mitglied der AP-2-Familie in Chondrozyten, wie auch im malignen Melanom, als ein Transkriptionsregulator beschrieben [233] und als solcher für die Differenzierung von Chondrozyten essentiell. Der Verlust von AP-2 α in Knockout-Mäusen wurde bereits mit Defekten des Skeletts in Zusammenhang gebracht [88; 89]. Die AP-2 α Knockout-Maus zeigt extreme Abnormalitäten im Kopf- und Körperbereich wie Enzephalien, kraniofaziale Defekte und Thorako-Abdominoschisis. In Studien mit einer AP-2 ϵ Knockout-Maus konnte allerdings kein offensichtlicher Knorpel-Phänotyp beschrieben werden (Moser, unveröffentlichte Daten). Möglicherweise kann auf Grund der Ko-Expression von verschiedenen AP-2 Isoformen im Knorpel der Verlust von AP-2 ϵ durch andere AP-2 Proteine kompensiert werden.

Allerdings kann die positive Regulation der Integrin $\alpha 10$ Expression durch AP-2 ϵ ein wichtiges Ereignis für das Bestehen einer intakten Matrix sein, da Integrin $\alpha 10$ als Rezeptor für Kollagen Typ II in Chondrozyten zur Aufrechterhaltung der Knorpelmatrix beiträgt. Diese wiederum ist für die Struktur und Funktion des Knorpels unumgänglich.

2.3. Die Expression von AP-2 ϵ in OA-Chondrozyten

Zusätzlich zur Analyse der Expression von AP-2 ϵ in Chondrozyten wurde diese auch in Chondrozyten von Osteoarthritis (OA)-Patienten untersucht. Es hat sich gezeigt, dass die Expression von AP-2 ϵ und auch von dessen Zielgen *integrin $\alpha 10$* in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten um ein Vielfaches erhöht ist.

Es bleibt nach wie vor unklar, wie es zur Entwicklung einer Osteoarthritis kommt und welche molekularen Veränderungen dieser Entwicklung zu Grunde liegen. Für einen gesunden Knorpel ist die Matrix, die die Chondrozyten umgibt, von großer Bedeutung. Im intakten Knorpel besteht ein Gleichgewicht zwischen der Synthese und der Degeneration der Matrixmoleküle, das für die Aufrechterhaltung der Struktur und die Funktion des Knorpels essentiell ist. Im Verlauf der Osteoarthritis kommt es zu einem Ungleichgewicht zwischen der katabolischen und der anabolischen Aktivität der Chondrozyten, was schließlich zur Zerstörung des gesamten Knorpels führt [234].

Ein weiterer Faktor, der zur Zerstörung des Knorpels und somit zur Entwicklung einer Osteoarthritis beiträgt, ist die mechanische Belastung der Gelenke. Im Laufe der Zeit nutzt sich die Knorpelschicht immer weiter ab. In diesem Zusammenhang ist auch das Alter der Patienten ausschlaggebend. Es wird angenommen, dass das Altern des Knorpels und die Seneszenz der Chondrozyten eine wichtige Rolle in der Pathogenese und Entwicklung der Osteoarthritis spielen [235; 236]. Viele Studien zeigen, dass die Seneszenz der Chondrozyten die Degeneration des Knorpels fördert, indem die Fähigkeit der Chondrozyten, den Gelenkknorpel aufrecht zu erhalten und zu reparieren, vermindert wird [235-237]. Mit zunehmendem Alter der Patienten nimmt demnach die mitotische und synthetische Aktivität der Chondrozyten ab. Eine weitere Theorie besagt, dass oxidativer Stress zum Altern von Chondrozyten und Knorpel führt und somit für die Entwicklung einer Osteoarthritis verantwortlich ist [238]. Oxidativer Stress induziert eine genomische Instabilität der Telomere, aber auch Seneszenz von Chondrozyten und ein daraus resultierendes Altern des Knorpels.

Eine Osteoarthritis zeichnet sich durch extrem niedrige Konzentrationen an Sauerstoff im Gewebe aus [231; 239]. Dieser Zustand wird als Hypoxie bezeichnet. Die zelluläre Antwort auf Hypoxie ist ein Gleichgewicht zwischen Anpassung und Zelltod und wird hauptsächlich durch den Transkriptionsfaktor HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) kontrolliert [240]. HIF-1 gehört zur PAS (PER-ARNT-SIM) Unterfamilie der basic helix-loop-helix (bHLH) Transkriptionsfaktoren. HIF-1 ist ein Heterodimer, das aus der konstitutiv exprimierten Untereinheit HIF-1 β und der Untereinheit HIF-1 α besteht, die als Reaktion auf Hypoxie gebildet wird [241]. Es konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α von fundamentaler Wichtigkeit für die Tumorigenese und für Entzündungsreaktionen ist [242; 243] und auch in Chondrozyten der Gelenke exprimiert wird [244; 245]. Zusätzlich haben Studien ergeben, dass mechanische Belastung und pro-inflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel Interleukin-1 β (IL-1 β) und der Tumornekrosefaktor-alpha (TNF- α) zu einer verstärkten Transkription von HIF-1 α Zielgenen führen [246]. Hierbei ist zu erwähnen, dass sowohl mechanische Belastung als auch pro-inflammatorische Zytokine zur Pathogenese der Osteoarthritis beitragen [247]. In OA-Chondrozyten wird HIF-1 α verstärkt exprimiert und wird mit dem Fortschreiten der Knorpeldegeneration in Verbindung gebracht [248; 249]. Es wird angenommen, dass die verstärkte Expression von HIF-1 α durch die Veränderungen in der Umgebung der Zellen im Gewebe, insbesondere dem Sauerstoffgehalt, ausgelöst wird [249; 250]. Chondrozyten des Gelenkknorpels exprimieren demnach HIF-1 α zur Anpassung an hypoxische Bedingungen in den tieferen Knorpelschichten und als Reaktion auf die

katabolischen Veränderungen im Knorpel, um damit die Lebensfähigkeit der Zellen aufrecht zu erhalten. Im Verlauf der Entwicklung einer Osteoarthritis wird die Expression von HIF-1 α verstärkt, um das Überleben der Zellen bei den Veränderungen in der Umgebung zu sichern [249]. Möglicherweise besteht ein Zusammenhang zwischen der verstärkten HIF-1 α Expression unter hypoxischen Bedingungen und der Expression von AP-2 ϵ , denn auch in den späteren Stadien der Chondrogenese herrschen Hypoxie-ähnliche Bedingungen in den hypertrophen Knorpelschichten.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, steigt die Expression von AP-2 ϵ erst relativ spät in der Differenzierung der Chondrozyten an, was vermuten lässt, dass der Transkriptionsfaktor mit der hypertrophen Knorpelentwicklung im Zusammenhang stehen könnte. Da auch in OA-Chondrozyten Hypertrophie nachzuweisen ist und die Expression von AP-2 ϵ und dessen Zielgen *integrin alpha10* in diesen Zellen ebenfalls erhöht ist, könnte dies auf eine Funktion von AP-2 ϵ in der Krankheitsentwicklung hindeuten. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, dass AP-2 ϵ durch HIF-1 α reguliert wird. Allerdings müssen noch weitere Untersuchungen gemacht werden, um diese These zu stützen.

2.4. Identifizierung von weiteren Zielgenen von AP-2 ϵ in OA-Chondrozyten

Zur genaueren Analyse der Rolle von AP-2 ϵ in der Differenzierung von Chondrozyten und in der Entwicklung einer Osteoarthritis stand die Suche nach weiteren Zielgenen im Vordergrund, die durch den Transkriptionsfaktor reguliert werden. Um genomweit nach AP-2 ϵ regulierten Zielgenen suchen zu können, wurde ein GeneChip[®] Human Promoter 1.0R Array durchgeführt, auf dem sich die Promotorbereiche von 25.000 humanen Genen als Sonden befinden. Es wurde je ein Array mit einem Positiv- (+AK) und einem Negativ (-AK)-Ansatz von immunpräzipitierten Promotor-Fragmenten von OA-Chondrozyten hybridisiert. Nach der Auswertung der Daten konnten 94 potentiell durch AP-2 ϵ regulierte Gene ermittelt werden, die wiederum in funktionelle Gruppen eingeordnet wurden. Dabei wurde deutlich, dass die meisten durch AP-2 ϵ regulierten Gene an Transkriptions- und Translationsvorgängen beteiligt sind (23 %). Weitere potentiell regulierte Gene sind Rezeptoren und Liganden (16 %) oder Signalmoleküle (13 %). In einem nächsten Schritt wurde begonnen, einige ausgewählte Gene näher zu charakterisieren, von denen bereits bekannt ist, dass sie an Differenzierungsvorgängen in Chondrozyten beteiligt und für diese essentiell sind.

Zunächst konnte durch quantitative Expressionsanalysen bestätigt werden, dass diese Gene in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten differentiell reguliert werden. Dies wird auf die verstärkte Expression von AP-2 ϵ in den OA-Chondrozyten zurückgeführt. Eine direkte Regulation der identifizierten Zielgene durch AP-2 ϵ muss allerdings noch nachgewiesen werden. Hierfür könnten zum Beispiel Reporter-gen-Assays oder Gelretardationsexperimente durchgeführt werden.

Interessanterweise befinden sich unter den identifizierten, potentiellen Zielgenen von AP-2 ϵ einige Transkriptionsfaktoren, von denen bereits bekannt ist, dass sie eine wichtige Rolle in der Differenzierung von Chondrozyten spielen.

Pitx1 (paired-like homeodomain 1) ist ein Transkriptionsfaktor, der zur Familie der “paired class of homeodomain“ Proteine gehört [251]. Während der Mausentwicklung wird Pitx1 in den Gelenken und im Perichondrium der langen Knochen der hinteren Gliedmaßen verstärkt exprimiert [252; 253]. Mäuse mit einer homozygoten Deletion des *pitx1* Gens sterben kurz nach der Geburt mit schwerwiegenden Fehlbildungen am Kopf und an den hinteren Extremitäten. Die Inaktivierung des *pitx1* Gens verdeutlicht dessen wichtige Funktion in der Skelettentwicklung.

Die Rolle von Pitx1 in der Osteoarthritis ist bisher allerdings nicht beschrieben. Wie die Expressionsanalyse von Pitx1 in differenzierten Chondrozyten im Vergleich zu OA-Chondrozyten aber zuvor gezeigt hat, ist die Expression von Pitx1 in letzteren stark vermindert. Diese Ergebnisse wurden kürzlich auch von Picard und Kollegen bestätigt, die eine Fehlregulation von Pitx1 in OA-Chondrozyten zeigten und Pitx1 in diesen Zellen im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten aufgrund der geringen Expression nicht mehr nachweisen konnten [254]. Dies lässt darauf schließen, dass die verminderte Expression von Pitx1 für die Entwicklung der Osteoarthritis wichtig ist. Durch weitere Analysen muss nun allerdings noch geklärt werden, welche Funktion Pitx1 in der Krankheitsentwicklung hat und welche Rolle die Regulation durch AP-2 ϵ dabei spielt.

Der Transkriptionsfaktor **Runx1** (runt-related transcription factor 1) ist ein Mitglied der Runx-Proteinfamilie, die entscheidend an der Chondrogenese und der Skelettentwicklung beteiligt ist [255; 256]. Dabei vermittelt Runx1 eher frühe Ereignisse der Chondrozytendifferenzierung und Knochenbildung. Eine virusinduzierte Überexpression von Runx1 in mesenchymalen Zellen von Mausembryonen aktiviert frühe Chondrozyten-Differenzierungsmarker, aber nicht den hypertrophen Marker Kollagen Typ X [255]. Im Gegensatz dazu ist von Runx2 bekannt, dass dieser Transkriptionsfaktor für die späte Entwicklung zu hypertrophem Knorpel notwendig ist [192; 257]. Für den

Transkriptionsfaktor Runx2 wurde bereits beschrieben, dass dieser eine Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielt [258].

In dem hier durchgeführten Promotor-Array zur Identifikation von Zielgenen von AP-2 ϵ hat sich gezeigt, dass AP-2 ϵ an den Promotor von *runx1* bindet und die Transkription des Gens möglicherweise reguliert. Expressionsanalysen haben ergeben, dass Runx1 in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten verstärkt exprimiert wird. Dies lässt vermuten, dass Runx1, wie es auch schon für Runx2 bekannt ist, eine wichtige Rolle in der Osteoarthritis spielt. Nach neuesten Erkenntnissen kann in blutbildenden Zellen der Transkriptionsfaktor Runx1 direkt mit HIF-1 α , dem Hauptregulatorprotein bei Hypoxie, interagieren [259]. Peng und Kollegen konnten kürzlich zeigen, dass HIF-1 α das Vermögen zur DNA-Bindung und die transkriptionelle Aktivität von *runx1* steigert, wodurch die Differenzierung von blutbildenden Zellen gefördert wird. Möglicherweise können HIF-1 α und Runx1 auch in Chondrozyten interagieren, was unter Hypoxiebedingungen zum Schutz der Zellen beitragen könnte. Unter diesen Gesichtspunkten wäre die positive Regulation von *runx1* durch AP-2 ϵ sinnvoll, da auch zwischen AP-2 ϵ und den hypertrophen Schichten des Knorpels ein Zusammenhang besteht.

Auch der Transkriptionsfaktor **Sox5** (SRY (sex determining region Y)-box 5) konnte als ein potentiell Zielgen von AP-2 ϵ identifiziert werden und wird in OA-Chondrozyten, verglichen mit differenzierten Chondrozyten, verstärkt exprimiert. Sox5 ist zusammen mit Sox6 ein essentieller Faktor in der frühen Differenzierung von Chondrozyten [187; 260]. Smits und Kollegen konnten außerdem zeigen, dass Sox5 und Sox6 auch im späteren Verlauf der Chondrogenese, für die Induktion der Entwicklung zum hypertrophen Knorpel wichtig sind [261]. In neueren Analysen mit Stammzellen aus dem Kniebereich von Osteoarthritis-Patienten wurde der Einfluss von Hypoxie auf die Genexpression und die Chondrogenese untersucht. Unter hypoxischen Bedingungen konnte neben anderen Genen auch eine verstärkte Expression von HIF-2 α , aber nicht HIF-1 α , sowie Sox5 und Sox6 nachgewiesen werden [262]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor Sox5, der hier als Zielgen von AP-2 ϵ identifiziert werden konnte, ebenfalls eine wichtige Rolle in der Osteoarthritis spielt, wobei diese allerdings noch genauer untersucht werden muss.

Als ein weiteres potentiell Zielgen von AP-2 ϵ konnte **CXCL1** (chemokine (C-X-C-motiv) ligand 1), auch bekannt als *GRO α* (growth-related oncogene α), ermittelt werden. Wie sich hier herausgestellt hat, ist die Expression von CXCL1 in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten um ein Vielfaches verstärkt. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits veröffentlichten Daten von anderen Arbeitsgruppen überein [263; 264].

CXCL1 gehört zur Gruppe der Chemokine, die für den Ablauf von Entzündungsreaktionen wichtig sind [265]. In Leukozyten vermitteln Chemokine die Zelladhäsion und Migration über definierte Signaltransduktionsmechanismen, wie den p38 MAPK (mitogen-activated protein kinase) Signalweg [266; 267]. In Chondrozyten führt die Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs sowohl zu einer hypertrophen Differenzierung als auch zur Apoptose [268; 269]. In einer Studie konnte gezeigt werden, dass CXCL1 über den p38 MAPK Signalweg die hypertrophe Differenzierung der Chondrozyten und auch eine Verkalkung induziert [270]. Es wird angenommen, dass Chondrozyten, die in OA-Knorpel hyperthroph differenziert oder apoptotisch sind, eine Verkalkung des Gelenks hervorrufen, die der hypertrophen Entwicklung der Chondrozyten während der Mineralisierung der Wachstumsfugen gleicht [271]. Eine Verkalkung des OA-Knorpels fördert eine Entzündungsreaktion, die wiederum den weiteren Abbau des Knorpels bewirkt. Zusätzlich stimuliert CXCL1 auch die Apoptose von Chondrozyten [272].

Da *CXCL1* als mögliches Zielgen von AP-2 ϵ identifiziert wurde und die Expression von CXCL1 in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten deutlich verstärkt ist, lässt dies vermuten, dass auch die Aktivierung von *CXCL1* durch AP-2 ϵ für die Entwicklung der Osteoarthritis von großer Bedeutung ist.

TGF β 3 und **Smad7** sind Moleküle, die am TGF β -Signalweg beteiligt sind. Auch für diese Gene konnte hier eine Promotorbindung durch den Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ nachgewiesen werden. Mitglieder der TGF β -Familie fördern die Chondrogenese und auch die Osteogenese [169]. Smad7 ist als Inhibitor des TGF β -Signalwegs bekannt. Es interagiert mit TGF β /BMP-Rezeptoren oder direkt mit Rezeptor-Smads, wodurch die Translokation des aktivierten Smad-Komplexes in den Zellkern verhindert wird [273]. Expressionsanalysen zeigen, dass beide Moleküle in differenzierten Chondrozyten und in OA-Knorpel exprimiert werden [274; 275]. Sowohl TGF β 3 als auch Smad7 werden in OA-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten verstärkt exprimiert. Im Verlauf der Osteoarthritis kommt es zu Entzündungsreaktionen und im Zuge dessen auch zur verstärkten Expression von Zytokinen, wie TNF α (tumor necrosis factor α) und IL-1 β (interleukin-1 β) [247]. Dadurch wird unter anderem die Expression von TGF β 3 beeinflusst. Möglicherweise ist die differentielle Regulation von TGF β 3 und dem Inhibitor Smad7 durch AP-2 ϵ im Zusammenhang mit Entzündungsreaktionen während der Osteoarthritis zu sehen.

Auch **RGS3** und **RGS12** (regulator of G-protein signaling) konnten als potentielle Zielgene von AP-2 ϵ mit Hilfe des Promotor-Arrays identifiziert werden. Die RGS-Familie umfasst mindestens 20 Mitglieder, die an der G-Protein Signaltransduktion beteiligt sind [276]. In der

Knorpelentwicklung ist die Rolle der RGS-Proteine weitgehend unbekannt. Während der Differenzierung von Chondrozyten wird *RGS2* differentiell reguliert [277]. Es konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von *RGS2* in der chondrogenen Zelllinie ATDC5 die hyperthrophe Differenzierung beschleunigt. Analysen mit weiteren Mitgliedern der RGS-Familie, *RGS4*, *RGS5*, *RGS7* und *RGS10*, führten ebenfalls zu dem Ergebnis, dass diese RGS-Proteine Regulatoren der Chondrogenese sind [278]. Allerdings ist bis jetzt nicht bekannt, welche Rolle RGS-Gene in der Osteoarthritis spielen. Die Familienmitglieder *RGS3* und *RGS12* werden in OA-Chondrozyten verstärkt exprimiert und möglicherweise durch AP-2 ϵ reguliert. Auch für diese Zielgene sind weitere Analysen notwendig, um die genaue Funktion dieser Proteine in der Erkrankung und deren Regulation durch AP-2 ϵ zu klären.

Der Promotor-Array zur genomweiten Suche nach AP-2 ϵ regulierten Zielgenen hat viele Daten für weiterführende Analysen geliefert. Eine direkte Regulation der hier dargestellten Zielgene durch AP-2 ϵ muss noch durch ein geeignetes Modellsystem bestätigt werden. Die ersten Expressionsanalysen deuten aber darauf hin, dass der Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ für die Entwicklung der Osteoarthritis eine sehr wichtige Rolle spielt. Um diese Hypothese zu stützen, sind weiterführende Versuche zur Klärung der Funktion notwendig.

Sehr interessant ist auch die These, dass ein Zusammenhang zwischen der Expression von AP-2 ϵ und der Entwicklung zum hypertrophen Knorpel besteht. Diese Vermutung muss ebenfalls durch anschließende Analysen weiter untersucht werden.

Die Untersuchung der Funktion von Integrin $\alpha 10$ und dessen Regulation durch AP-2 ϵ in dieser Arbeit verhilft zum Verständnis der Entwicklung und Progression des malignen Melanoms. Zusätzlich können die hier gewonnenen Erkenntnisse neue Einblicke in die Differenzierung von Chondrozyten und die Entwicklung der Osteoarthritis liefern.

Durch die genomweite Suche nach möglichen Zielgenen, die durch den Transkriptionsfaktor AP-2 ϵ in OA-Chondrozyten reguliert werden, sind viele neue Daten entstanden, die zukünftig weiter bearbeitet werden können. Auf diese Weise wird es vielleicht möglich sein, neue Hypothesen über die Entstehung der Osteoarthritis aufzustellen und diese eventuell auch zu bestätigen.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte die Rolle und Regulation des Zelloberflächenmoleküls Integrin alpha10 bei der Entstehung und Progression des malignen Melanoms untersucht werden.

Durch einen Expressionsarray gab es Hinweise, dass Integrin alpha10 in Melanomzellen im Vergleich zu normalen humanen epidermalen Melanozyten (NHEM) verstärkt exprimiert wird. Expressionsanalysen bestätigten, dass Integrin alpha10 sowohl *in vitro* in Melanomzelllinien als auch *in vivo* in Primärtumoren und in Metastasen im Vergleich zu NHEMs verstärkt exprimiert wird.

Durch computergestützte Analysen der Promotorsequenz von *integrin alpha10* konnten Konsensusbindestellen für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 identifiziert werden. Beide Transkriptionsfaktoren spielen eine wichtige Rolle in der Melanomentwicklung und -progression. Ets-1 wird im malignen Melanom verstärkt exprimiert und fördert dessen Entwicklung und Invasion. AP-2 ist als ein negativer Regulator der Tumorentwicklung bekannt. Im Verlauf der Melanomentwicklung kommt es zu einem Verlust von AP-2, wodurch die Metastasierung des Tumors gefördert wird. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ets-1 im malignen Melanom ein Aktivator der Transkription von *integrin alpha10* ist, wohingegen AP-2 *integrin alpha10* konzentrationsabhängig reprimiert.

Zur Klärung der funktionellen Relevanz der verstärkten Integrin alpha10 Expression in Melanomzellen wurden verschiedene Assays durchgeführt. Dafür wurden Zellklone generiert, die Integrin alpha10 nur noch vermindert exprimieren. Es hat sich gezeigt, dass Integrin alpha10 die gerichtete Migration der Melanomzellen fördert. Da in weiteren funktionellen Tests die Verminderung von Integrin alpha10 zu keiner Veränderung der Proliferation, der Invasion oder des Matrix-unabhängigen Wachstums der Zellen führte, wird vermutet, dass die Funktion von Integrin alpha10 in Melanomzellen durch andere Integrine ersetzt werden kann. Möglicherweise wird bei Verlust von Integrin alpha10 die Funktion des Proteins von anderen Kollagen-bindenden Integrinen übernommen.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde die transkriptionelle Regulation von *integrin alpha10* in Chondrozyten analysiert, da Integrin alpha10 auch in diesen Zellen exprimiert wird, die Regulation allerdings nicht bekannt ist.

Auch hier hat sich bestätigt, dass die Expression von Integrin alpha10 durch die zwei Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 reguliert wird. Ets-1 wirkt dabei wiederum, wie auch im malignen Melanom, als Aktivator der Transkription. Interessanterweise und im Gegensatz

zu den Ergebnissen im Melanom aktiviert AP-2 in Chondrozyten die Transkription von *integrin alpha10*. Mit Hilfe von Gelretardationsexperimenten konnte AP-2 ϵ als die Isoform der AP-2-Familie identifiziert werden, die an den Promotor von *integrin alpha10* bindet.

Durch weitere Analysen konnte die Expression von AP-2 ϵ in Chondrozyten *in vitro* und *in vivo* bestätigt werden. Dabei zeigte sich auch, dass AP-2 ϵ erst spät im Verlauf der Differenzierung der Chondrozyten in der hypertrophen Phase exprimiert wird.

Des Weiteren werden AP-2 ϵ und dessen Zielgen Integrin alpha10 auch in Chondrozyten von Osteoarthritispatienten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten verstärkt exprimiert. Um genomweit nach weiteren AP-2 ϵ -Zielgenen zu suchen, wurde ein GeneChip[®] Human Promoter 1.0R Array mit immunpräzipitierten Promotorfragmenten von Osteoarthritis-Chondrozyten durchgeführt. Die erste experimentelle Bestätigung potentieller Zielgene hat gezeigt, dass *runx1*, *sox5*, *CXCL1*, *TGF β 3*, *smad7*, *RGS3* und *RGS12* in Osteoarthritis-Chondrozyten im Vergleich zu differenzierten Chondrozyten verstärkt, *pitx1* dagegen vermindert exprimiert werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass Integrin alpha10 im malignen Melanom die gerichtete Migration fördert und somit zur Entwicklung des Tumors beiträgt. Sowohl in Melanomzellen als auch in Chondrozyten konnte der Mechanismus der transkriptionellen Regulation von *integrin alpha10* aufgeklärt werden. Die zwei Transkriptionsfaktoren Ets-1 und AP-2 sind Regulatoren der Integrin alpha10 Expression.

In Chondrozyten und auch in Osteoarthritis-Chondrozyten aktiviert AP-2 ϵ die Transkription von *integrin alpha10*. Durch eine genomweite Suche nach AP-2 ϵ Bindestellen mit Hilfe eines Promotorarrays konnten noch weitere AP-2 ϵ -Zielgene identifiziert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- [1] M.Y.Hsu, F.Meier, M.Herlyn, Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host *Differentiation* 70, (2002) 522-536.
- [2] W.H.Clark, Tumour progression and the nature of cancer *Br.J.Cancer* 64, (1991) 631-644.
- [3] W.H.Clark, Jr., D.E.Elder, D.Guerry, M.N.Epstein, M.H.Greene, H.M.Van, A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma *Hum.Pathol.* 15, (1984) 1147-1165.
- [4] F.A.van der, A.Sonnenberg, Function and interactions of integrins *Cell Tissue Res.* 305, (2001) 285-298.
- [5] T.J.Hieken, M.Farolan, S.G.Ronan, A.Shilkaitis, L.Wild, T.K.Das Gupta, Beta3 integrin expression in melanoma predicts subsequent metastasis *J.Surg.Res.* 63, (1996) 169-173.
- [6] P.A.Van Belle, R.Elenitsas, K.Satyamoorthy, J.T.Wolfe, D.Guerry, L.Schuchter, T.J.Van Belle, S.Albelda, P.Tahin, M.Herlyn, D.E.Elder, Progression-related expression of beta3 integrin in melanomas and nevi *Hum.Pathol.* 30, (1999) 562-567.
- [7] J.Gille, R.A.Swerlick, Integrins: role in cell adhesion and communication *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 797, (1996) 93-106.
- [8] M.J.Humphries, Integrin structure *Biochem.Soc.Trans.* 28, (2000) 311-339.
- [9] Y.Takada, T.Kamata, A.Irie, W.Puzon-McLaughlin, X.P.Zhang, Structural basis of integrin-mediated signal transduction *Matrix Biol.* 16, (1997) 143-151.
- [10] M.J.Humphries, Integrin activation: the link between ligand binding and signal transduction *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, (1996) 632-640.
- [11] C.Brakebusch, R.Fassler, The integrin-actin connection, an eternal love affair *EMBO J.* 22, (2003) 2324-2333.
- [12] R.O.Hynes, Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion *Cell* 69, (1992) 11-25.
- [13] M.A.Schwartz, M.D.Schaller, M.H.Ginsberg, Integrins: emerging paradigms of signal transduction *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* 11, (1995) 549-599.
- [14] J.E.Meredith, Jr., S.Winitz, J.M.Lewis, S.Hess, X.D.Ren, M.W.Renshaw, M.A.Schwartz, The regulation of growth and intracellular signaling by integrins *Endocr.Rev.* 17, (1996) 207-220.
- [15] E.Ruoslahti, J.C.Reed, Anchorage dependence, integrins, and apoptosis *Cell* 77, (1994) 477-478.

-
- [16] S.M.Frisch, E.Ruoslahti, Integrins and anoikis *Curr.Opin.Cell Biol.* 9, (1997) 701-706.
- [17] J.A.Varner, D.A.Chersesh, Integrins and cancer *Curr.Opin.Cell Biol.* 8, (1996) 724-730.
- [18] J.A.Varner, D.A.Chersesh, Tumor angiogenesis and the role of vascular cell integrin alphavbeta3 Important *Adv.Oncol.*(1996) 69-87.
- [19] R.L.Juliano, J.A.Varner, Adhesion molecules in cancer: the role of integrins *Curr.Opin.Cell Biol.* 5, (1993) 812-818.
- [20] P.C.Brooks, Role of integrins in angiogenesis *Eur.J.Cancer* 32A, (1996) 2423-2429.
- [21] B.Holzmann, U.Gossler, M.Bittner, alpha 4 integrins and tumor metastasis *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 231, (1998) 125-141.
- [22] R.E.Seftor, E.A.Seftor, M.J.Hendrix, Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion *Cancer Metastasis Rev.* 18, (1999) 359-375.
- [23] S.Kuphal, R.Bauer, A.K.Bosserhoff, Integrin signaling in malignant melanoma *Cancer Metastasis Rev.* 24, (2005) 195-222.
- [24] S.Moretti, L.Martini, E.Berti, C.Pinzi, B.Giannotti, Adhesion molecule profile and malignancy of melanocytic lesions *Melanoma Res.* 3, (1993) 235-239.
- [25] M.E.Hartstein, A.S.Grove, Jr., J.J.Woog, The role of the integrin family of adhesion molecules in the development of tumors metastatic to the orbit *Ophthal.Plast.Reconstr.Surg.* 13, (1997) 227-238.
- [26] J.Nikkola, P.Vihinen, T.Vlaykova, M.Hahka-Kemppinen, J.Heino, S.Pyrhonen, Integrin chains beta1 and alphav as prognostic factors in human metastatic melanoma *Melanoma Res.* 14, (2004) 29-37.
- [27] S.M.Albelda, S.A.Mette, D.E.Elder, R.Stewart, L.Damjanovich, M.Herlyn, C.A.Buck, Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression *Cancer Res.* 50, (1990) 6757-6764.
- [28] E.H.Danen, K.F.Jansen, A.A.Van Kraats, I.M.Cornelissen, D.J.Ruiter, G.N.Van Muijen, Alpha v-integrins in human melanoma: gain of alpha v beta 3 and loss of alpha v beta 5 are related to tumor progression in situ but not to metastatic capacity of cell lines in nude mice *Int.J.Cancer* 61, (1995) 491-496.
- [29] M.Y.Hsu, D.T.Shih, F.E.Meier, B.P.Van, J.Y.Hsu, D.E.Elder, C.A.Buck, M.Herlyn, Adenoviral gene transfer of beta3 integrin subunit induces conversion from radial to vertical growth phase in primary human melanoma *Am.J.Pathol.* 153, (1998) 1435-1442.
- [30] L.Camper, U.Hellman, E.Lundgren-Akerlund, Isolation, cloning, and sequence analysis of the integrin subunit alpha10, a beta1-associated collagen binding integrin expressed on chondrocytes *J.Biol.Chem.* 273, (1998) 20383-20389.
- [31] K.Lehnert, J.Ni, E.Leung, S.Gough, C.M.Morris, D.Liu, S.X.Wang, R.Langley, G.W.Krissansen, The integrin alpha10 subunit: expression pattern, partial gene

- structure, and chromosomal localization *Cytogenet. Cell Genet.* 87, (1999) 238-244.
- [32] L.Camper, K.Holmval, C.Wangnerud, A.Aszodi, E.Lundgren-Akerlund, Distribution of the collagen-binding integrin $\alpha 10\beta 1$ during mouse development *Cell Tissue Res.* 306, (2001) 107-116.
- [33] T.Bengtsson, A.Aszodi, C.Nicolae, E.B.Hunziker, E.Lundgren-Akerlund, R.Fassler, Loss of $\alpha 10\beta 1$ integrin expression leads to moderate dysfunction of growth plate chondrocytes *J. Cell Sci.* 118, (2005) 929-936.
- [34] H.Aberle, H.Schwartz, R.Kemler, Cadherin-catenin complex: protein interactions and their implications for cadherin function *J. Cell Biochem.* 61, (1996) 514-523.
- [35] F.Nollet, P.Kools, R.F.van, Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members *J. Mol. Biol.* 299, (2000) 551-572.
- [36] S.T.Suzuki, Structural and functional diversity of cadherin superfamily: are new members of cadherin superfamily involved in signal transduction pathway? *J. Cell Biochem.* 61, (1996) 531-542.
- [37] M.J.Hendrix, E.A.Seftor, P.S.Meltzer, L.M.Gardner, A.R.Hess, D.A.Kirschmann, G.C.Schatteman, R.E.Seftor, Expression and functional significance of VE-cadherin in aggressive human melanoma cells: role in vasculogenic mimicry *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, (2001) 8018-8023.
- [38] R.Silye, A.J.Karayiannakis, K.N.Syrgios, S.Poole, N.S.van, W.Batchelor, H.Regele, W.Sega, H.Boesmueller, T.Krausz, M.Pignatelli, E-cadherin/catenin complex in benign and malignant melanocytic lesions *J. Pathol.* 186, (1998) 350-355.
- [39] L.Larue, M.Ohsugi, J.Hirchenhain, R.Kemler, E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91, (1994) 8263-8267.
- [40] J.A.Marrs, W.J.Nelson, Cadherin cell adhesion molecules in differentiation and embryogenesis *Int. Rev. Cytol.* 165, (1996) 159-205.
- [41] J.Behrens, Cadherins and catenins: role in signal transduction and tumor progression *Cancer Metastasis Rev.* 18, (1999) 15-30.
- [42] D.S.Sanders, K.Blessing, G.A.Hassan, R.Bruton, J.R.Marsden, J.Jankowski, Alterations in cadherin and catenin expression during the biological progression of melanocytic tumours *Mol. Pathol.* 52, (1999) 151-157.
- [43] M.Y.Hsu, M.J.Wheelock, K.R.Johnson, M.Herlyn, Shifts in cadherin profiles between human normal melanocytes and melanomas *J. Invest. Dermatol. Symp. Proc.* 1, (1996) 188-194.
- [44] I.Poser, D.Dominguez, A.G.de Herreros, A.Varnai, R.Buettner, A.K.Bosserhoff, Loss of E-cadherin expression in melanoma cells involves up-regulation of the transcriptional repressor Snail *J. Biol. Chem.* 276, (2001) 24661-24666.

-
- [45] G.Li, K.Satyamoorthy, M.Herlyn, N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells *Cancer Res.* 61, (2001) 3819-3825.
- [46] T.Bogenrieder, M.Herlyn, Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis *Oncogene* 22, (2003) 6524-6536.
- [47] Y.Nakabeppu, K.Ryder, D.Nathans, DNA binding activities of three murine Jun proteins: stimulation by Fos *Cell* 55, (1988) 907-915.
- [48] A.Urabe, J.Nakayama, S.Taniguchi, H.Terao, Y.Hori, Expression of the c-fos oncogene in chemically-induced mouse tumours and in human skin tumours *J.Pathol.* 168, (1992) 281-286.
- [49] T.Hai, M.G.Hartman, The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis *Gene* 273, (2001) 1-11.
- [50] S.Xie, J.E.Price, M.Luca, D.Jean, Z.Ronai, M.Bar-Eli, Dominant-negative CREB inhibits tumor growth and metastasis of human melanoma cells *Oncogene* 15, (1997) 2069-2075.
- [51] T.Furusawa, H.Moribe, H.Kondoh, Y.Higashi, Identification of CtBP1 and CtBP2 as corepressors of zinc finger-homeodomain factor deltaEF1 *Mol.Cell Biol.* 19, (1999) 8581-8590.
- [52] I.Poser, M.Golob, M.Weidner, R.Buettner, A.K.Bosserhoff, Down-regulation of COOH-terminal binding protein expression in malignant melanomas leads to induction of MIA expression *Cancer Res.* 62, (2002) 5962-5966.
- [53] A.Seth, R.Ascione, R.J.Fisher, G.J.Mavrothalassitis, N.K.Bhat, T.S.Papas, The ets gene family *Cell Growth Differ.* 3, (1992) 327-334.
- [54] I.Poser, A.K.Bosserhoff, Transcription factors involved in development and progression of malignant melanoma *Histol.Histopathol.* 19, (2004) 173-188.
- [55] T.Rothhammer, J.C.Hahne, A.Florin, I.Poser, F.Soncin, N.Wernert, A.K.Bosserhoff, The Ets-1 transcription factor is involved in the development and invasion of malignant melanoma *Cell Mol.Life Sci.* 61, (2004) 118-128.
- [56] I.Poser, M.Golob, R.Buettner, A.K.Bosserhoff, Upregulation of HMG1 leads to melanoma inhibitory activity expression in malignant melanoma cells and contributes to their malignancy phenotype *Mol.Cell Biol.* 23, (2003) 2991-2998.
- [57] W.M.van de, M.Oosterwegel, F.Holstege, D.Dooyes, R.Suijkerbuijk, K.A.Geurts van, H.Clevers, The human T cell transcription factor-1 gene. Structure, localization, and promoter characterization *J.Biol.Chem.* 267, (1992) 8530-8536.

-
- [58] M.Tachibana, Evidence to suggest that expression of MITF induces melanocyte differentiation and haploinsufficiency of MITF causes Waardenburg syndrome type 2A *Pigment Cell Res.* 10, (1997) 25-33.
- [59] G.G.McGill, M.Horstmann, H.R.Widlund, J.Du, G.Motyckova, E.K.Nishimura, Y.L.Lin, S.Ramaswamy, W.Avery, H.F.Ding, S.A.Jordan, I.J.Jackson, S.J.Korsmeyer, T.R.Golub, D.E.Fisher, Bcl2 regulation by the melanocyte master regulator Mitf modulates lineage survival and melanoma cell viability *Cell* 109, (2002) 707-718.
- [60] Y.M.Janssen-Heininger, M.E.Poynter, P.A.Baeuerle, Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappaB *Free Radic.Biol.Med.* 28, (2000) 1317-1327.
- [61] M.Karin, Y.Cao, F.R.Greten, Z.W.Li, NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit *Nat.Rev.Cancer* 2, (2002) 301-310.
- [62] J.Yang, A.Richmond, Constitutive IkappaB kinase activity correlates with nuclear factor-kappaB activation in human melanoma cells *Cancer Res.* 61, (2001) 4901-4909.
- [63] S.Kuphal, I.Poser, C.Jobin, C.Hellerbrand, A.K.Bosserhoff, Loss of E-cadherin leads to upregulation of NFkappaB activity in malignant melanoma *Oncogene* 23, (2004) 8509-8519.
- [64] S.Fumagalli, L.Doneda, N.Nomura, L.Larizza, Expression of the c-ski proto-oncogene in human melanoma cell lines *Melanoma Res.* 3, (1993) 23-27.
- [65] I.Poser, T.Rothhammer, S.Dooley, R.Weiskirchen, A.K.Bosserhoff, Characterization of Sno expression in malignant melanoma *Int.J.Oncol.* 26, (2005) 1411-1417.
- [66] Y.Sun, X.Liu, E.N.Eaton, W.S.Lane, H.F.Lodish, R.A.Weinberg, Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling *Mol.Cell* 4, (1999) 499-509.
- [67] W.Xu, K.Angelis, D.Danielpour, M.M.Haddad, O.Bischof, J.Campisi, E.Stavnezer, E.E.Medrano, Ski acts as a co-repressor with Smad2 and Smad3 to regulate the response to type beta transforming growth factor *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 97, (2000) 5924-5929.
- [68] M.A.Nieto, The snail superfamily of zinc-finger transcription factors *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 3, (2002) 155-166.
- [69] A.Cano, M.A.Perez-Moreno, I.Rodrigo, A.Locascio, M.J.Blanco, M.G.del Barrio, F.Portillo, M.A.Nieto, The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression *Nat.Cell Biol.* 2, (2000) 76-83.
- [70] S.Kuphal, H.G.Palm, I.Poser, A.K.Bosserhoff, Snail-regulated genes in malignant melanoma *Melanoma Res.* 15, (2005) 305-313.
- [71] M.Bohm, U.Schulte, J.O.Funk, M.Raghunath, I.Behrmann, M.Kortylewski, P.C.Heinrich, T.Kues, T.A.Luger, T.Schwarz, Interleukin-6-resistant

- melanoma cells exhibit reduced activation of STAT3 and lack of inhibition of cyclin E-associated kinase activity *J.Invest Dermatol.* 117, (2001) 132-140.
- [72] G.Niu, T.Bowman, M.Huang, S.Shivers, D.Reintgen, A.Daud, A.Chang, A.Kraker, R.Jove, H.Yu, Roles of activated Src and Stat3 signaling in melanoma tumor cell growth *Oncogene* 21, (2002) 7001-7010.
- [73] P.J.Mitchell, C.Wang, R.Tjian, Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen *Cell* 50, (1987) 847-861.
- [74] M.Oulad-Abdelghani, P.Bouillet, C.Chazaud, P.Dolle, P.Chambon, AP-2.2: a novel AP-2-related transcription factor induced by retinoic acid during differentiation of P19 embryonal carcinoma cells *Exp.Cell Res.* 225, (1996) 338-347.
- [75] R.Buettner, M.Moser, A.Pscherer, A.Imhof, R.Bauer, F.Hofstaedter, [Molecular cloning of a new AP-2 transcription factor, AP-2beta, and its function in cell differentiation] *Verh.Dtsch.Ges.Pathol.* 78, (1994) 38-42.
- [76] M.Moser, A.Imhof, A.Pscherer, R.Bauer, W.Amselgruber, F.Sinowatz, F.Hofstadter, R.Schule, R.Buettner, Cloning and characterization of a second AP-2 transcription factor: AP-2 beta *Development* 121, (1995) 2779-2788.
- [77] F.Zhao, T.Lufkin, B.D.Gelb, Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis *Gene Expr.Patterns.* 3, (2003) 213-217.
- [78] U.Werling, H.Schorle, Transcription factor gene AP-2 gamma essential for early murine development *Mol.Cell Biol.* 22, (2002) 3149-3156.
- [79] H.V.Wang, K.Vaupel, R.Buettner, A.K.Bosserhoff, M.Moser, Identification and embryonic expression of a new AP-2 transcription factor, AP-2 epsilon *Dev.Dyn.* 231, (2004) 128-135.
- [80] R.Tummala, R.A.Romano, E.Fuchs, S.Sinha, Molecular cloning and characterization of AP-2 epsilon, a fifth member of the AP-2 family *Gene* 321, (2003) 93-102.
- [81] K.Hilger-Eversheim, M.Moser, H.Schorle, R.Buettner, Regulatory roles of AP-2 transcription factors in vertebrate development, apoptosis and cell-cycle control *Gene* 260, (2000) 1-12.
- [82] S.Wankhade, Y.Yu, J.Weinberg, M.A.Tainsky, P.Kannan, Characterization of the activation domains of AP-2 family transcription factors *J.Biol.Chem.* 275, (2000) 29701-29708.
- [83] T.Williams, A.Admon, B.Luscher, R.Tjian, Cloning and expression of AP-2, a cell-type-specific transcription factor that activates inducible enhancer elements *Genes Dev.* 2, (1988) 1557-1569.
- [84] P.J.Mitchell, P.M.Timmons, J.M.Hebert, P.W.Rigby, R.Tjian, Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis *Genes Dev.* 5, (1991) 105-119.

-
- [85] M.Moser, J.Ruschoff, R.Buettner, Comparative analysis of AP-2 alpha and AP-2 beta gene expression during murine embryogenesis *Dev.Dyn.* 208, (1997) 115-124.
- [86] F.Zhao, T.Lufkin, B.D.Gelb, Expression of Tfap2d, the gene encoding the transcription factor Ap-2 delta, during mouse embryogenesis *Gene Expr.Patterns.* 3, (2003) 213-217.
- [87] C.Chazaud, M.Oulad-Abdelghani, P.Bouillet, D.Decimo, P.Chambon, P.Dolle, AP-2.2, a novel gene related to AP-2, is expressed in the forebrain, limbs and face during mouse embryogenesis *Mech.Dev.* 54, (1996) 83-94.
- [88] H.Schorle, P.Meier, M.Buchert, R.Jaenisch, P.J.Mitchell, Transcription factor AP-2 essential for cranial closure and craniofacial development *Nature* 381, (1996) 235-238.
- [89] J.Zhang, S.Hagopian-Donaldson, G.Serbedzija, J.Elsemore, D.Plehn-Dujowich, A.P.McMahon, R.A.Flavell, T.Williams, Neural tube, skeletal and body wall defects in mice lacking transcription factor AP-2 *Nature* 381, (1996) 238-241.
- [90] M.Moser, A.Pscherer, C.Roth, J.Becker, G.Mucher, K.Zerres, C.Dixkens, J.Weis, L.Guay-Woodford, R.Buettner, R.Fassler, Enhanced apoptotic cell death of renal epithelial cells in mice lacking transcription factor AP-2beta *Genes Dev.* 11, (1997) 1938-1948.
- [91] H.J.Auman, T.Nottoli, O.Lakiza, Q.Winger, S.Donaldson, T.Williams, Transcription factor AP-2gamma is essential in the extra-embryonic lineages for early postimplantation development *Development* 129, (2002) 2733-2747.
- [92] B.C.Turner, J.Zhang, A.A.Gumbs, M.G.Maher, L.Kaplan, D.Carter, P.M.Glazer, H.C.Hurst, B.G.Haffty, T.Williams, Expression of AP-2 transcription factors in human breast cancer correlates with the regulation of multiple growth factor signalling pathways *Cancer Res.* 58, (1998) 5466-5472.
- [93] J.M.Gee, J.F.Robertson, I.O.Ellis, R.I.Nicholson, H.C.Hurst, Immunohistochemical analysis reveals a tumour suppressor-like role for the transcription factor AP-2 in invasive breast cancer *J.Pathol.* 189, (1999) 514-520.
- [94] O.Nyormoi, M.Bar-Eli, Transcriptional regulation of metastasis-related genes in human melanoma *Clin.Exp.Metastasis* 20, (2003) 251-263.
- [95] M.Bar-Eli, Role of AP-2 in tumor growth and metastasis of human melanoma *Cancer Metastasis Rev.* 18, (1999) 377-385.
- [96] J.M.Karjalainen, J.K.Kellokoski, M.J.Eskelinen, E.M.Alhava, V.M.Kosma, Downregulation of transcription factor AP-2 predicts poor survival in stage I cutaneous malignant melanoma *J.Clin.Oncol.* 16, (1998) 3584-3591.
- [97] M.Bar-Eli, Gene regulation in melanoma progression by the AP-2 transcription factor *Pigment Cell Res.* 14, (2001) 78-85.
- [98] D.Jean, J.E.Gershenwald, S.Huang, M.Luca, M.J.Hudson, M.A.Tainsky, M.Bar-Eli, Loss of AP-2 results in up-regulation of MCAM/MUC18 and an increase in

- tumor growth and metastasis of human melanoma cells *J.Biol.Chem.* 273, (1998) 16501-16508.
- [99] S.Huang, D.Jean, M.Luca, M.A.Tainsky, M.Bar-Eli, Loss of AP-2 results in downregulation of c-KIT and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis *EMBO J.* 17, (1998) 4358-4369.
- [100] C.Tellez, M.McCarty, M.Ruiz, M.Bar-Eli, Loss of activator protein-2alpha results in overexpression of protease-activated receptor-1 and correlates with the malignant phenotype of human melanoma *J.Biol.Chem.* 278, (2003) 46632-46642.
- [101] C.Tellez, M.Bar-Eli, Role and regulation of the thrombin receptor (PAR-1) in human melanoma *Oncogene* 22, (2003) 3130-3137.
- [102] C.S.Tellez, D.W.Davis, V.G.Prieto, J.E.Gershenwald, M.M.Johnson, M.F.McCarty, M.Bar-Eli, Quantitative analysis of melanocytic tissue array reveals inverse correlation between activator protein-2alpha and protease-activated receptor-1 expression during melanoma progression *J.Invest Dermatol.* 127, (2007) 387-393.
- [103] E.Suyama, H.Minoshima, H.Kawasaki, K.Taira, Identification of AP-2-regulated genes by macroarray profiling of gene expression in human A375P melanoma *Nucleic Acids Res.Suppl*(2002) 247-248.
- [104] A.Blesch, A.K.Bosserhoff, R.Apfel, C.Behl, B.Hessdoerfer, A.Schmitt, P.Jachimczak, F.Lottspeich, R.Buettner, U.Bogdahn, Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA *Cancer Res.* 54, (1994) 5695-5701.
- [105] U.H.Dietz, L.J.Sandell, Cloning of a retinoic acid-sensitive mRNA expressed in cartilage and during chondrogenesis *J.Biol.Chem.* 271, (1996) 3311-3316.
- [106] N.D.Rendtorff, M.Frodin, T.ttie-Bitach, M.Vekemans, N.Tommerup, Identification and characterization of an inner ear-expressed human melanoma inhibitory activity (MIA)-like gene (MIAL) with a frequent polymorphism that abolishes translation *Genomics* 71, (2001) 40-52.
- [107] N.G.Robertson, S.Heller, J.S.Lin, B.L.Resendes, S.Weremowicz, C.S.Denis, A.M.Bell, A.J.Hudspeth, C.C.Morton, A novel conserved cochlear gene, OTOR: identification, expression analysis, and chromosomal mapping *Genomics* 66, (2000) 242-248.
- [108] M.Cohen-Salmon, D.Frenz, W.Liu, E.Verpy, S.Voegeling, C.Petit, Fdp, a new fibrocyte-derived protein related to MIA/CD-RAP, has an in vitro effect on the early differentiation of the inner ear mesenchyme *J.Biol.Chem.* 275, (2000) 40036-40041.
- [109] A.K.Bosserhoff, M.Moser, R.Buettner, Characterization and expression pattern of the novel MIA homolog TANGO *Gene Expr.Patterns.* 4, (2004) 473-479.

-
- [110] A.K.Bosserhoff, M.Moser, J.Scholmerich, R.Buettner, C.Hellerbrand, Specific expression and regulation of the new melanoma inhibitory activity-related gene MIA2 in hepatocytes *J.Biol.Chem.* 278, (2003) 15225-15231.
- [111] J.J.van Groningen, H.P.Bloemers, G.W.Swart, Identification of melanoma inhibitory activity and other differentially expressed messenger RNAs in human melanoma cell lines with different metastatic capacity by messenger RNA differential display *Cancer Res.* 55, (1995) 6237-6243.
- [112] A.K.Bosserhoff, R.Hein, U.Bogdahn, R.Buettner, Structure and promoter analysis of the gene encoding the human melanoma-inhibiting protein MIA *J.Biol.Chem.* 271, (1996) 490-495.
- [113] A.Blesch, A.K.Bosserhoff, R.Apfel, C.Behl, B.Hessdoerfer, A.Schmitt, P.Jachimczak, F.Lottspeich, R.Buettner, U.Bogdahn, Cloning of a novel malignant melanoma-derived growth-regulatory protein, MIA *Cancer Res.* 54, (1994) 5695-5701.
- [114] A.K.Bosserhoff, M.Lederer, M.Kaufmann, R.Hein, W.Stolz, R.Apfel, U.Bogdahn, R.Buettner, MIA, a novel serum marker for progression of malignant melanoma *Anticancer Res.* 19, (1999) 2691-2693.
- [115] A.K.Bosserhoff, M.Kaufmann, B.Kaluza, I.Bartke, H.Zirngibl, R.Hein, W.Stolz, R.Buettner, Melanoma-inhibiting activity, a novel serum marker for progression of malignant melanoma *Cancer Res.* 57, (1997) 3149-3153.
- [116] J.Stahlecker, A.Gauger, A.Bosserhoff, R.Buettner, J.Ring, R.Hein, MIA as a reliable tumor marker in the serum of patients with malignant melanoma *Anticancer Res.* 20, (2000) 5041-5044.
- [117] A.K.Bosserhoff, S.Kondo, M.Moser, U.H.Dietz, N.G.Copeland, D.J.Gilbert, N.A.Jenkins, R.Buettner, L.J.Sandell, Mouse CD-RAP/MIA gene: structure, chromosomal localization, and expression in cartilage and chondrosarcoma *Dev.Dyn.* 208, (1997) 516-525.
- [118] A.K.Bosserhoff, R.Buettner, Establishing the protein MIA (melanoma inhibitory activity) as a marker for chondrocyte differentiation *Biomaterials* 24, (2003) 3229-3234.
- [119] P.V.Thorogood, J.R.Hinchliffe, An analysis of the condensation process during chondrogenesis in the embryonic chick hind limb *J.Embryol.Exp.Morphol.* 33, (1975) 581-606.
- [120] M.Y.Janners, R.L.Searls, Changes in rate of cellular proliferation during the differentiation of cartilage and muscle in the mesenchyme of the embryonic chick wing *Dev.Biol.* 23, (1970) 136-165.
- [121] W.Dessau, M.H.von der, M.K.von der, S.Fischer, Changes in the patterns of collagens and fibronectin during limb-bud chondrogenesis *J.Embryol.Exp.Morphol.* 57, (1980) 51-60.
- [122] C.B.Knudson, B.P.Toole, Changes in the pericellular matrix during differentiation of limb bud mesoderm *Dev.Biol.* 112, (1985) 308-318.

-
- [123] E.J.Mackie, L.I.Murphy, The role of tenascin-C and related glycoproteins in early chondrogenesis *Microsc.Res.Tech.* 43, (1998) 102-110.
- [124] W.M.Kulyk, W.B.Upholt, R.A.Kosher, Fibronectin gene expression during limb cartilage differentiation *Development* 106, (1989) 449-455.
- [125] R.A.Kosher, W.M.Kulyk, S.W.Gay, Collagen gene expression during limb cartilage differentiation *J.Cell Biol.* 102, (1986) 1151-1156.
- [126] R.E.Swidorski, M.Solursh, Localization of type II collagen, long form alpha 1(IX) collagen, and short form alpha 1(IX) collagen transcripts in the developing chick notochord and axial skeleton *Dev.Dyn.* 194, (1992) 118-127.
- [127] W.M.Kulyk, C.N.Coelho, R.A.Kosher, Type IX collagen gene expression during limb cartilage differentiation *Matrix* 11, (1991) 282-288.
- [128] G.Luo, R.D'Souza, D.Hogue, G.Karsenty, The matrix Gla protein gene is a marker of the chondrogenesis cell lineage during mouse development *J.Bone Miner.Res.* 10, (1995) 325-334.
- [129] V.C.Hascall, T.R.Oegema, M.Brown, Isolation and characterization of proteoglycans from chick limb bud chondrocytes grown in vitro *J.Biol.Chem.* 251, (1976) 3511-3519.
- [130] P.A.Tsonis, E.Walker, Cell populations synthesizing cartilage proteoglycan core protein in the early chick limb bud *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 174, (1991) 688-695.
- [131] N.S.Stirpe, P.F.Goetinck, Gene regulation during cartilage differentiation: temporal and spatial expression of link protein and cartilage matrix protein in the developing limb *Development* 107, (1989) 23-33.
- [132] R.O.Kelley, J.F.Fallon, A freeze-fracture and morphometric analysis of gap junctions of limb bud cells: initial studies on a possible mechanism for morphogenetic signalling during development *Prog.Clin.Biol.Res.* 110 Pt A, (1983) 119-130.
- [133] C.N.Coelho, R.A.Kosher, Gap junctional communication during limb cartilage differentiation *Dev.Biol.* 144, (1991) 47-53.
- [134] S.Tavella, P.Raffo, C.Tacchetti, R.Cancedda, P.Castagnola, N-CAM and N-cadherin expression during in vitro chondrogenesis *Exp.Cell Res.* 215, (1994) 354-362.
- [135] S.A.Oberlender, R.S.Tuan, Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis *Development* 120, (1994) 177-187.
- [136] S.A.Oberlender, R.S.Tuan, Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme *Cell Adhes.Comm.* 2, (1994) 521-537.
- [137] S.A.Oberlender, R.S.Tuan, Application of functional blocking antibodies. N-cadherin and chick embryonic limb development *Methods Mol.Biol.* 137, (2000) 37-42.
- [138] C.M.Chuong, R.B.Widelitz, T.X.Jiang, U.K.Abbott, Y.S.Lee, H.M.Chen, Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with

- antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation *Prog.Clin.Biol.Res.* 383B, (1993) 465-474.
- [139] R.B.Widelitz, T.X.Jiang, B.A.Murray, C.M.Chuong, Adhesion molecules in skeletogenesis: II. Neural cell adhesion molecules mediate precartilaginous mesenchymal condensations and enhance chondrogenesis *J.Cell Physiol* 156, (1993) 399-411.
- [140] M.Enomoto, P.S.Leboy, A.S.Menko, D.Boettiger, Beta 1 integrins mediate chondrocyte interaction with type I collagen, type II collagen, and fibronectin *Exp.Cell Res.* 205, (1993) 276-285.
- [141] M.Shakibaei, B.Zimmermann, H.J.Merker, Changes in integrin expression during chondrogenesis in vitro: an immunomorphological study *J.Histochem.Cytochem.* 43, (1995) 1061-1069.
- [142] M.Shakibaei, H.J.Merker, Beta1-integrins in the cartilage matrix *Cell Tissue Res.* 296, (1999) 565-573.
- [143] M.Shakibaei, Inhibition of chondrogenesis by integrin antibody in vitro *Exp.Cell Res.* 240, (1998) 95-106.
- [144] A.L.Gehris, S.A.Oberlender, K.J.Shepley, R.S.Tuan, V.D.Bennett, Fibronectin mRNA alternative splicing is temporally and spatially regulated during chondrogenesis in vivo and in vitro *Dev.Dyn.* 206, (1996) 219-230.
- [145] A.L.Gehris, E.Stringa, J.Spina, M.E.Desmond, R.S.Tuan, V.D.Bennett, The region encoded by the alternatively spliced exon IIIA in mesenchymal fibronectin appears essential for chondrogenesis at the level of cellular condensation *Dev.Biol.* 190, (1997) 191-205.
- [146] D.G.White, J.W.Hall, D.W.Brandli, A.L.Gehris, V.D.Bennett, Chick cartilage fibronectin differs in structure from the fibronectin in limb mesenchyme *Exp.Cell Res.* 224, (1996) 391-402.
- [147] V.D.Bennett, K.M.Pallante, S.L.Adams, The splicing pattern of fibronectin mRNA changes during chondrogenesis resulting in an unusual form of the mRNA in cartilage *J.Biol.Chem.* 266, (1991) 5918-5924.
- [148] N.J.Hickok, A.R.Haas, R.S.Tuan, Regulation of chondrocyte differentiation and maturation *Microsc.Res.Tech.* 43, (1998) 174-190.
- [149] C.Wu, S.Y.Keightley, C.Leung-Hagesteijn, G.Radeva, M.Coppolino, S.Goicoechea, J.A.McDonald, S.Dedhar, Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assembly, E-cadherin expression, and tumorigenicity *J.Biol.Chem.* 273, (1998) 528-536.
- [150] A.Novak, S.C.Hsu, C.Leung-Hagesteijn, G.Radeva, J.Papkoff, R.Montesano, C.Roskelley, R.Grosschedl, S.Dedhar, Cell adhesion and the integrin-linked kinase regulate the LEF-1 and beta-catenin signaling pathways *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 95, (1998) 4374-4379.

-
- [151] M.Delcommenne, C.Tan, V.Gray, L.Rue, J.Woodgett, S.Dedhar, Phosphoinositide-3-OH kinase-dependent regulation of glycogen synthase kinase 3 and protein kinase B/AKT by the integrin-linked kinase Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 95, (1998) 11211-11216.
- [152] K.M.Cadigan, R.Nusse, Wnt signaling: a common theme in animal development Genes Dev. 11, (1997) 3286-3305.
- [153] K.M.Cadigan, Y.I.Liu, Wnt signaling: complexity at the surface J.Cell Sci. 119, (2006) 395-402.
- [154] R.Nusse, H.E.Varmus, Wnt genes Cell 69, (1992) 1073-1087.
- [155] B.Rubinfeld, I.Albert, E.Porfiri, C.Fiol, S.Munemitsu, P.Polakis, Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly Science 272, (1996) 1023-1026.
- [156] K.Orford, C.Crockett, J.P.Jensen, A.M.Weissman, S.W.Byers, Serine phosphorylation-regulated ubiquitination and degradation of beta-catenin J.Biol.Chem. 272, (1997) 24735-24738.
- [157] H.Aberle, A.Bauer, J.Stappert, A.Kispert, R.Kemler, beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway EMBO J. 16, (1997) 3797-3804.
- [158] F.Fagotto, U.Gluck, B.M.Gumbiner, Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin Curr.Biol. 8, (1998) 181-190.
- [159] O.Huber, R.Korn, J.McLaughlin, M.Ohsugi, B.G.Herrmann, R.Kemler, Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1 Mech.Dev. 59, (1996) 3-10.
- [160] V.Korinek, N.Barker, K.Willert, M.Molenaar, J.Roose, G.Wagenaar, M.Markman, W.Lamers, O.Destree, H.Clevers, Two members of the Tcf family implicated in Wnt/beta-catenin signaling during embryogenesis in the mouse Mol.Cell Biol. 18, (1998) 1248-1256.
- [161] L.Waltzer, M.Bienz, Drosophila CBP represses the transcription factor TCF to antagonize Wingless signalling Nature 395, (1998) 521-525.
- [162] A.M.DeLise, L.Fischer, R.S.Tuan, Cellular interactions and signaling in cartilage development Osteoarthritis.Cartilage. 8, (2000) 309-334.
- [163] L.Fischer, G.Boland, R.S.Tuan, Wnt signaling during BMP-2 stimulation of mesenchymal chondrogenesis J.Cell Biochem. 84, (2002) 816-831.
- [164] J.A.Rudnicki, A.M.Brown, Inhibition of chondrogenesis by Wnt gene expression in vivo and in vitro Dev.Biol. 185, (1997) 104-118.
- [165] M.Kengaku, J.Capdevila, C.Rodriguez-Esteban, P.J.De La, R.L.Johnson, J.C.Belmonte, C.J.Tabin, Distinct WNT pathways regulating AER formation and dorsoventral polarity in the chick limb bud Science 280, (1998) 1274-1277.

-
- [166] L.Fischer, G.Boland, R.S.Tuan, Wnt-3A enhances bone morphogenetic protein-2-mediated chondrogenesis of murine C3H10T1/2 mesenchymal cells *J.Biol.Chem.* 277, (2002) 30870-30878.
- [167] M.Centrella, M.C.Horowitz, J.M.Wozney, T.L.McCarthy, Transforming growth factor-beta gene family members and bone *Endocr.Rev.* 15, (1994) 27-39.
- [168] D.J.Rickard, T.A.Sullivan, B.J.Shenker, P.S.Leboy, I.Kazhdan, Induction of rapid osteoblast differentiation in rat bone marrow stromal cell cultures by dexamethasone and BMP-2 *Dev.Biol.* 161, (1994) 218-228.
- [169] E.F.Roark, K.Greer, Transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein-2 act by distinct mechanisms to promote chick limb cartilage differentiation in vitro *Dev.Dyn.* 200, (1994) 103-116.
- [170] J.Alvarez, P.Sohn, X.Zeng, T.Doetschman, D.J.Robbins, R.Serra, TGFbeta2 mediates the effects of hedgehog on hypertrophic differentiation and PTHrP expression *Development* 129, (2002) 1913-1924.
- [171] D.B.Pateder, C.M.Ferguson, A.M.Ionescu, E.M.Schwarz, R.N.Rosier, J.E.Puzas, R.J.O'Keefe, PTHrP expression in chick sternal chondrocytes is regulated by TGF-beta through Smad-mediated signaling *J.Cell Physiol* 188, (2001) 343-351.
- [172] M.Kretzschmar, J.Massague, SMADs: mediators and regulators of TGF-beta signaling *Curr.Opin.Genet.Dev.* 8, (1998) 103-111.
- [173] C.F.Lai, S.L.Cheng, Signal transductions induced by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor-beta in normal human osteoblastic cells *J.Biol.Chem.* 277, (2002) 15514-15522.
- [174] T.Ishitani, J.Ninomiya-Tsuji, S.Nagai, M.Nishita, M.Meneghini, N.Barker, M.Waterman, B.Bowerman, H.Clevers, H.Shibuya, K.Matsumoto, The TAK1-NLK-MAPK-related pathway antagonizes signalling between beta-catenin and transcription factor TCF *Nature* 399, (1999) 798-802.
- [175] W.M.van de, H.Clevers, Sequence-specific interaction of the HMG box proteins TCF-1 and SRY occurs within the minor groove of a Watson-Crick double helix *EMBO J.* 11, (1992) 3039-3044.
- [176] L.J.Ng, S.Wheatley, G.E.Muscat, J.Conway-Campbell, J.Bowles, E.Wright, D.M.Bell, P.P.Tam, K.S.Cheah, P.Koopman, SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse *Dev.Biol.* 183, (1997) 108-121.
- [177] S.Wheatley, E.Wright, Y.Jeske, A.McCormack, J.Bowles, P.Koopman, Aetiology of the skeletal dysmorphology syndrome campomelic dysplasia: expression of the Sox9 gene during chondrogenesis in mouse embryos *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 785, (1996) 350-352.
- [178] Q.Zhao, H.Eberspaecher, V.Lefebvre, C.B.De, Parallel expression of Sox9 and Col2a1 in cells undergoing chondrogenesis *Dev.Dyn.* 209, (1997) 377-386.

-
- [179] J.W.Foster, M.A.Dominguez-Steglich, S.Guioli, G.Kowk, P.A.Weller, M.Stevanovic, J.Weissenbach, S.Mansour, I.D.Young, P.N.Goodfellow, ., Campomelic dysplasia and autosomal sex reversal caused by mutations in an SRY-related gene *Nature* 372, (1994) 525-530.
- [180] W.Bi, J.M.Deng, Z.Zhang, R.R.Behringer, C.B.de, Sox9 is required for cartilage formation *Nat.Genet.* 22, (1999) 85-89.
- [181] H.Akiyama, M.C.Chaboissier, J.F.Martin, A.Schedl, C.B.De, The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6 *Genes Dev.* 16, (2002) 2813-2828.
- [182] D.M.Bell, K.K.Leung, S.C.Wheatley, L.J.Ng, S.Zhou, K.W.Ling, M.H.Sham, P.Koopman, P.P.Tam, K.S.Cheah, SOX9 directly regulates the type-II collagen gene *Nat.Genet.* 16, (1997) 174-178.
- [183] W.F.Xie, X.Zhang, S.Sakano, V.Lefebvre, L.J.Sandell, Trans-activation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by Sox9 *J.Bone Miner.Res.* 14, (1999) 757-763.
- [184] Y.Kamachi, M.Uchikawa, H.Kondoh, Pairing SOX off: with partners in the regulation of embryonic development *Trends Genet.* 16, (2000) 182-187.
- [185] T.Furumatsu, M.Tsuda, N.Taniguchi, Y.Tajima, H.Asahara, Smad3 induces chondrogenesis through the activation of SOX9 via CREB-binding protein/p300 recruitment *J.Biol.Chem.* 280, (2005) 8343-8350.
- [186] V.Lefebvre, P.Li, C.B.de, A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene *EMBO J.* 17, (1998) 5718-5733.
- [187] P.Smits, P.Li, J.Mandel, Z.Zhang, J.M.Deng, R.R.Behringer, C.B.De, V.Lefebvre, The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation *Dev.Cell* 1, (2001) 277-290.
- [188] I.S.Kim, F.Otto, B.Zabel, S.Mundlos, Regulation of chondrocyte differentiation by Cbfa1 *Mech.Dev.* 80, (1999) 159-170.
- [189] C.A.Yoshida, T.Komori, Role of Runx proteins in chondrogenesis *Crit Rev.Eukaryot.Gene Expr.* 15, (2005) 243-254.
- [190] S.Takeda, J.P.Bonnamy, M.J.Owen, P.Ducy, G.Karsenty, Continuous expression of Cbfa1 in nonhypertrophic chondrocytes uncovers its ability to induce hypertrophic chondrocyte differentiation and partially rescues Cbfa1-deficient mice *Genes Dev.* 15, (2001) 467-481.
- [191] C.A.Yoshida, H.Yamamoto, T.Fujita, T.Furuichi, K.Ito, K.Inoue, K.Yamana, A.Zanma, K.Takada, Y.Ito, T.Komori, Runx2 and Runx3 are essential for chondrocyte maturation, and Runx2 regulates limb growth through induction of Indian hedgehog *Genes Dev.* 18, (2004) 952-963.

-
- [192] Q.Zheng, G.Zhou, R.Morello, Y.Chen, X.Garcia-Rojas, B.Lee, Type X collagen gene regulation by Runx2 contributes directly to its hypertrophic chondrocyte-specific expression in vivo *J.Cell Biol.* 162, (2003) 833-842.
- [193] M.Kundu, A.Javed, J.P.Jeon, A.Horner, L.Shum, M.Eckhaus, M.Muenke, J.B.Lian, Y.Yang, G.H.Nuckolls, G.S.Stein, P.P.Liu, Cbfbeta interacts with Runx2 and has a critical role in bone development *Nat.Genet.* 32, (2002) 639-644.
- [194] C.A.Yoshida, T.Furuichi, T.Fujita, R.Fukuyama, N.Kanatani, S.Kobayashi, M.Satake, K.Takada, T.Komori, Core-binding factor beta interacts with Runx2 and is required for skeletal development *Nat.Genet.* 32, (2002) 633-638.
- [195] D.Ferrari, R.A.Kosher, Dlx5 is a positive regulator of chondrocyte differentiation during endochondral ossification *Dev.Biol.* 252, (2002) 257-270.
- [196] R.F.Robledo, L.Rajan, X.Li, T.Lufkin, The Dlx5 and Dlx6 homeobox genes are essential for craniofacial, axial, and appendicular skeletal development *Genes Dev.* 16, (2002) 1089-1101.
- [197] C.Magee, M.Nurminskaya, L.Faverman, P.Galera, T.F.Linsenmayer, SP3/SP1 transcription activity regulates specific expression of collagen type X in hypertrophic chondrocytes *J.Biol.Chem.* 280, (2005) 25331-25338.
- [198] H.Roca, M.Phimphilai, R.Gopalakrishnan, G.Xiao, R.T.Franceschi, Cooperative interactions between RUNX2 and homeodomain protein-binding sites are critical for the osteoblast-specific expression of the bone sialoprotein gene *J.Biol.Chem.* 280, (2005) 30845-30855.
- [199] C.Tribioli, M.Frasch, T.Lufkin, Bapx1: an evolutionary conserved homologue of the *Drosophila* bagpipe homeobox gene is expressed in splanchnic mesoderm and the embryonic skeleton *Mech.Dev.* 65, (1997) 145-162.
- [200] H.Peters, B.Wilm, N.Sakai, K.Imai, R.Maas, R.Balling, Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development *Development* 126, (1999) 5399-5408.
- [201] I.Rodrigo, R.E.Hill, R.Balling, A.Munsterberg, K.Imai, Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome *Development* 130, (2003) 473-482.
- [202] C.Tribioli, T.Lufkin, The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen *Development* 126, (1999) 5699-5711.
- [203] H.Herbrand, O.Pabst, R.Hill, H.H.Arnold, Transcription factors Nkx3.1 and Nkx3.2 (Bapx1) play an overlapping role in sclerotomal development of the mouse *Mech.Dev.* 117, (2002) 217-224.
- [204] D.A.Bisgrove, R.Godbout, Differential expression of AP-2alpha and AP-2beta in the developing chick retina: repression of R-FABP promoter activity by AP-2 *Dev.Dyn.* 214, (1999) 195-206.

-
- [205] S.R.Davies, S.Sakano, Y.Zhu, L.J.Sandell, Distribution of the transcription factors Sox9, AP-2, and [delta]EF1 in adult murine articular and meniscal cartilage and growth plate *J.Histochem.Cytochem.* 50, (2002) 1059-1065.
- [206] W.F.Xie, S.Kondo, L.J.Sandell, Regulation of the mouse cartilage-derived retinoic acid-sensitive protein gene by the transcription factor AP-2 *J.Biol.Chem.* 273, (1998) 5026-5032.
- [207] J.D.Dignam, P.L.Martin, B.S.Shastry, R.G.Roeder, Eukaryotic gene transcription with purified components *Methods Enzymol.* 101, (1983) 582-598.
- [208] P.K.Smith, R.I.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, D.C.Klenk, Measurement of protein using bicinchoninic acid *Anal.Biochem.* 150, (1985) 76-85.
- [209] U.K.Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* 227, (1970) 680-685.
- [210] A.K.Wenke, T.Rothhammer, M.Moser, A.K.Bosserhoff, Regulation of integrin alpha10 expression in chondrocytes by the transcription factors AP-2epsilon and Ets-1 *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 345, (2006) 495-501.
- [211] A.K.Wenke, C.Kjellman, E.Lundgren-Akerlund, C.Uhlmann, N.K.Haass, M.Herlyn, A.K.Bosserhoff, Expression of integrin alpha10 is induced in malignant melanoma *Cell Oncol.* 29, (2007) 373-386.
- [212] J.C.Hahne, A.F.Okuducu, A.Kaminski, A.Florin, F.Soncin, N.Wernert, Ets-1 expression promotes epithelial cell transformation by inducing migration, invasion and anchorage-independent growth *Oncogene* 24, (2005) 5384-5388.
- [213] N.Oda, M.Abe, Y.Sato, ETS-1 converts endothelial cells to the angiogenic phenotype by inducing the expression of matrix metalloproteinases and integrin beta3 *J.Cell Physiol* 178, (1999) 121-132.
- [214] N.Wernert, A.Stanjek, S.Kiriakidis, A.Hugel, H.C.Jha, R.Mazitschek, A.Giannis, Inhibition of Angiogenesis In Vivo by ets-1 Antisense Oligonucleotides-Inhibition of Ets-1 Transcription Factor Expression by the Antibiotic Fumagillin *Angew.Chem.Int.Ed Engl.* 38, (1999) 3228-3231.
- [215] T.Nakano, M.Abe, K.Tanaka, R.Shineha, S.Satomi, Y.Sato, Angiogenesis inhibition by transdominant mutant Ets-1 *J.Cell Physiol* 184, (2000) 255-262.
- [216] A.Pourtier-Manzanedo, C.Vercamer, B.E.Van, V.Mattot, F.Mouquet, B.Vandenbunder, Expression of an Ets-1 dominant-negative mutant perturbs normal and tumor angiogenesis in a mouse ear model *Oncogene* 22, (2003) 1795-1806.
- [217] S.A.Tahtakran, M.A.Selleck, Ets-1 expression is associated with cranial neural crest migration and vasculogenesis in the chick embryo *Gene Expr.Patterns.* 3, (2003) 455-458.
- [218] A.J.Berger, D.W.Davis, C.Tellez, V.G.Prieto, J.E.Gershenwald, M.M.Johnson, D.L.Rimm, M.Bar-Eli, Automated quantitative analysis of activator protein-

- 2alpha subcellular expression in melanoma tissue microarrays correlates with survival prediction *Cancer Res.* 65, (2005) 11185-11192.
- [219] A.Baldi, D.Santini, T.Battista, E.Dragonetti, G.Ferranti, T.Petitti, A.M.Groeger, A.Angelini, R.Rossiello, F.Baldi, P.G.Natali, M.G.Paggi, Expression of AP-2 transcription factor and of its downstream target genes c-kit, E-cadherin and p21 in human cutaneous melanoma *J.Cell Biochem.* 83, (2001) 364-372.
- [220] T.Rothhammer, I.Poser, F.Soncin, F.Bataille, M.Moser, A.K.Bosserhoff, Bone morphogenic proteins are overexpressed in malignant melanoma and promote cell invasion and migration *Cancer Res.* 65, (2005) 448-456.
- [221] S.Aznavoorian, M.L.Stracke, J.Parsons, J.McClanahan, L.A.Liotta, Integrin alphavbeta3 mediates chemotactic and haptotactic motility in human melanoma cells through different signaling pathways *J.Biol.Chem.* 271, (1996) 3247-3254.
- [222] R.H.Kramer, N.Marks, Identification of integrin collagen receptors on human melanoma cells *J.Biol.Chem.* 264, (1989) 4684-4688.
- [223] T.Velling, M.Kusche-Gullberg, T.Sejersen, D.Gullberg, cDNA cloning and chromosomal localization of human alpha(11) integrin. A collagen-binding, I domain-containing, beta(1)-associated integrin alpha-chain present in muscle tissues *J.Biol.Chem.* 274, (1999) 25735-25742.
- [224] M.Iwamoto, Y.Higuchi, M.Enomoto-Iwamoto, K.Kurisu, E.Koyama, H.Yeh, J.Rosenbloom, M.Pacifici, The role of ERG (ets related gene) in cartilage development *Osteoarthritis.Cartilage.* 9 Suppl A, (2001) S41-S47.
- [225] M.Iwamoto, Y.Tamamura, E.Koyama, T.Komori, N.Takeshita, J.A.Williams, T.Nakamura, M.Enomoto-Iwamoto, M.Pacifici, Transcription factor ERG and joint and articular cartilage formation during mouse limb and spine skeletogenesis *Dev.Biol.* 305, (2007) 40-51.
- [226] M.R.Plant, M.E.MacDonald, L.I.Grad, S.J.Ritchie, J.M.Richman, Locally released retinoic acid repatterns the first branchial arch cartilages in vivo *Dev.Biol.* 222, (2000) 12-26.
- [227] C.Duan, D.R.Clemmons, Transcription factor AP-2 regulates human insulin-like growth factor binding protein-5 gene expression *J.Biol.Chem.* 270, (1995) 24844-24851.
- [228] W.Feng, T.Williams, Cloning and characterization of the mouse AP-2 epsilon gene: a novel family member expressed in the developing olfactory bulb *Mol.Cell Neurosci.* 24, (2003) 460-475.
- [229] K.Lund-Olesen, Oxygen tension in synovial fluids *Arthritis Rheum.* 13, (1970) 769-776.
- [230] P.S.Treuhart, D.J.MCCarty, Synovial fluid pH, lactate, oxygen and carbon dioxide partial pressure in various joint diseases *Arthritis Rheum.* 14, (1971) 475-484.

-
- [231] T.Kiaer, J.Gronlund, K.H.Sorensen, Subchondral pO₂, pCO₂, pressure, pH, and lactate in human osteoarthritis of the hip Clin.Orthop.Relat Res.(1988) 149-155.
- [232] W.R.Ferrell, H.Najafipour, Changes in synovial PO₂ and blood flow in the rabbit knee joint due to stimulation of the posterior articular nerve J.Physiol 449, (1992) 607-617.
- [233] Z.Huang, H.Xu, L.Sandell, Negative regulation of chondrocyte differentiation by transcription factor AP-2alpha J.Bone Miner.Res. 19, (2004) 245-255.
- [234] T.Aigner, L.McKenna, Molecular pathology and pathobiology of osteoarthritic cartilage Cell Mol.Life Sci. 59, (2002) 5-18.
- [235] J.A.Martin, J.A.Buckwalter, Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis Iowa Orthop.J. 21, (2001) 1-7.
- [236] T.Aigner, B.Kurz, N.Fukui, L.Sandell, Roles of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis Curr.Opin.Rheumatol. 14, (2002) 578-584.
- [237] J.A.Martin, J.A.Buckwalter, Aging, articular cartilage chondrocyte senescence and osteoarthritis Biogerontology. 3, (2002) 257-264.
- [238] K.Yudoh, T.Nguyen, H.Nakamura, K.Hongo-Masuko, T.Kato, K.Nishioka, Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function Arthritis Res.Ther. 7, (2005) R380-R391.
- [239] D.Pfander, K.Gelse, Hypoxia and osteoarthritis: how chondrocytes survive hypoxic environments Curr.Opin.Rheumatol. 19, (2007) 457-462.
- [240] G.L.Wang, G.L.Semenza, Characterization of hypoxia-inducible factor 1 and regulation of DNA binding activity by hypoxia J.Biol.Chem. 268, (1993) 21513-21518.
- [241] G.L.Wang, B.H.Jiang, E.A.Rue, G.L.Semenza, Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 92, (1995) 5510-5514.
- [242] T.Cramer, Y.Yamanishi, B.E.Clausen, I.Forster, R.Pawlinski, N.Mackman, V.H.Haase, R.Jaenisch, M.Corr, V.Nizet, G.S.Firestein, H.P.Gerber, N.Ferrara, R.S.Johnson, HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation Cell 112, (2003) 645-657.
- [243] E.Schipani, H.E.Ryan, S.Didrickson, T.Kobayashi, M.Knight, R.S.Johnson, Hypoxia in cartilage: HIF-1alpha is essential for chondrocyte growth arrest and survival Genes Dev. 15, (2001) 2865-2876.
- [244] T.Aigner, A.Zien, A.Gehrsitz, P.M.Gebhard, L.McKenna, Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology Arthritis Rheum. 44, (2001) 2777-2789.

- [245] D.G.Stokes, G.Liu, I.B.Coimbra, S.Piera-Velazquez, R.M.Crowl, S.A.Jimenez, Assessment of the gene expression profile of differentiated and dedifferentiated human fetal chondrocytes by microarray analysis *Arthritis Rheum.* 46, (2002) 404-419.
- [246] Y.J.Jung, J.S.Isaacs, S.Lee, J.Trepel, L.Neckers, IL-1beta-mediated up-regulation of HIF-1alpha via an NFkappaB/COX-2 pathway identifies HIF-1 as a critical link between inflammation and oncogenesis *FASEB J.* 17, (2003) 2115-2117.
- [247] C.S.Bonnet, D.A.Walsh, Osteoarthritis, angiogenesis and inflammation *Rheumatology.(Oxford)* 44, (2005) 7-16.
- [248] I.B.Coimbra, S.A.Jimenez, D.F.Hawkins, S.Piera-Velazquez, D.G.Stokes, Hypoxia inducible factor-1 alpha expression in human normal and osteoarthritic chondrocytes *Osteoarthritis.Cartilage.* 12, (2004) 336-345.
- [249] K.Yudoh, H.Nakamura, K.Masuko-Hongo, T.Kato, K.Nishioka, Catabolic stress induces expression of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 alpha in articular chondrocytes: involvement of HIF-1 alpha in the pathogenesis of osteoarthritis *Arthritis Res.Ther.* 7, (2005) R904-R914.
- [250] U.R.Jewell, I.Kvietikova, A.Scheid, C.Bauer, R.H.Wenger, M.Gassmann, Induction of HIF-1alpha in response to hypoxia is instantaneous *FASEB J.* 15, (2001) 1312-1314.
- [251] J.Drouin, B.Lamolet, T.Lamonerie, C.Lancot, J.J.Tremblay, The PTX family of homeodomain transcription factors during pituitary developments *Mol.Cell Endocrinol.* 140, (1998) 31-36.
- [252] C.Lancot, B.Lamolet, J.Drouin, The bicoid-related homeoprotein Ptx1 defines the most anterior domain of the embryo and differentiates posterior from anterior lateral mesoderm *Development* 124, (1997) 2807-2817.
- [253] J.Shang, Y.Luo, D.A.Clayton, Backfoot is a novel homeobox gene expressed in the mesenchyme of developing hind limb *Dev.Dyn.* 209, (1997) 242-253.
- [254] C.Picard, B.Azeddine, F.Moldovan, J.Martel-Pelletier, A.Moreau, New emerging role of pitx1 transcription factor in osteoarthritis pathogenesis *Clin.Orthop.Relat Res.* 462, (2007) 59-66.
- [255] Y.Wang, R.M.Belflower, Y.F.Dong, E.M.Schwarz, R.J.O'Keefe, H.Drissi, Runx1/AML1/Cbfa2 mediates onset of mesenchymal cell differentiation toward chondrogenesis *J.Bone Miner.Res.* 20, (2005) 1624-1636.
- [256] N.Smith, Y.Dong, J.B.Lian, J.Pratap, P.D.Kingsley, A.J.van Wijnen, J.L.Stein, E.M.Schwarz, R.J.O'Keefe, G.S.Stein, M.H.Drissi, Overlapping expression of Runx1(Cbfa2) and Runx2(Cbfa1) transcription factors supports cooperative induction of skeletal development *J.Cell Physiol* 203, (2005) 133-143.
- [257] M.Inada, T.Yasui, S.Nomura, S.Miyake, K.Deguchi, M.Himeno, M.Sato, H.Yamagiwa, T.Kimura, N.Yasui, T.Ochi, N.Endo, Y.Kitamura, T.Kishimoto, T.Komori, Maturational disturbance of chondrocytes in Cbfa1-deficient mice *Dev.Dyn.* 214, (1999) 279-290.

-
- [258] S.Kamekura, Y.Kawasaki, K.Hoshi, T.Shimoaka, H.Chikuda, Z.Maruyama, T.Komori, S.Sato, S.Takeda, G.Karsenty, K.Nakamura, U.I.Chung, H.Kawaguchi, Contribution of runt-related transcription factor 2 to the pathogenesis of osteoarthritis in mice after induction of knee joint instability *Arthritis Rheum.* 54, (2006) 2462-2470.
- [259] Z.G.Peng, M.Y.Zhou, Y.Huang, J.H.Qiu, L.S.Wang, S.H.Liao, S.Dong, G.Q.Chen, Physical and functional interaction of Runt-related protein 1 with hypoxia-inducible factor-1alpha *Oncogene*(2007).
- [260] V.Lefebvre, R.R.Behringer, C.B.De, L-Sox5, Sox6 and Sox9 control essential steps of the chondrocyte differentiation pathway *Osteoarthritis.Cartilage.* 9 Suppl A, (2001) S69-S75.
- [261] P.Smits, P.Dy, S.Mitra, V.Lefebvre, Sox5 and Sox6 are needed to develop and maintain source, columnar, and hypertrophic chondrocytes in the cartilage growth plate *J.Cell Biol.* 164, (2004) 747-758.
- [262] W.S.Khan, A.B.Adesida, T.E.Hardingham, Hypoxic conditions increase hypoxia-inducible transcription factor 2alpha and enhance chondrogenesis in stem cells from the infrapatellar fat pad of osteoarthritis patients *Arthritis Res.Ther.* 9, (2007) R55.
- [263] R.M.Borzi, I.Mazzetti, S.Macor, T.Silvestri, A.Bassi, L.Cattini, A.Facchini, Flow cytometric analysis of intracellular chemokines in chondrocytes in vivo: constitutive expression and enhancement in osteoarthritis and rheumatoid arthritis *FEBS Lett.* 455, (1999) 238-242.
- [264] K.Kanbe, K.Takagishi, Q.Chen, Stimulation of matrix metalloprotease 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4 *Arthritis Rheum.* 46, (2002) 130-137.
- [265] T.S.Olson, K.Ley, Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking *Am.J.Physiol Regul.Integr.Comp Physiol* 283, (2002) R7-28.
- [266] M.Takami, V.Terry, L.Petruzzelli, Signaling pathways involved in IL-8-dependent activation of adhesion through Mac-1 *J.Immunol.* 168, (2002) 4559-4566.
- [267] J.A.Nick, S.K.Young, P.G.Arndt, J.G.Lieber, B.T.Suratt, K.R.Poch, N.J.Avdi, K.C.Malcolm, C.Taube, P.M.Henson, G.S.Worthen, Selective suppression of neutrophil accumulation in ongoing pulmonary inflammation by systemic inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase *J.Immunol.* 169, (2002) 5260-5269.
- [268] X.Zhen, L.Wei, Q.Wu, Y.Zhang, Q.Chen, Mitogen-activated protein kinase p38 mediates regulation of chondrocyte differentiation by parathyroid hormone *J.Biol.Chem.* 276, (2001) 4879-4885.
- [269] J.P.Pelletier, J.C.Fernandes, D.V.Jovanovic, P.Reboul, J.Martel-Pelletier, Chondrocyte death in experimental osteoarthritis is mediated by MEK 1/2 and p38 pathways: role of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase *J.Rheumatol.* 28, (2001) 2509-2519.

-
- [270] D.Merz, R.Liu, K.Johnson, R.Terkeltaub, IL-8/CXCL8 and growth-related oncogene alpha/CXCL1 induce chondrocyte hypertrophic differentiation J.Immunol. 171, (2003) 4406-4415.
- [271] K.A.Johnson, E.D.van, N.Nanda, R.M.Graham, R.A.Terkeltaub, Distinct transglutaminase 2-independent and transglutaminase 2-dependent pathways mediate articular chondrocyte hypertrophy J.Biol.Chem. 278, (2003) 18824-18832.
- [272] R.M.Borzi, I.Mazzetti, G.Magagnoli, S.Paoletti, M.Uguccioni, R.Gatti, G.Orlandini, L.Cattini, A.Facchini, Growth-related oncogene alpha induction of apoptosis in osteoarthritis chondrocytes Arthritis Rheum. 46, (2002) 3201-3211.
- [273] Y.Shi, J.Massague, Mechanisms of TGF-beta signaling from cell membrane to the nucleus Cell 113, (2003) 685-700.
- [274] V.Moos, S.Fickert, B.Muller, U.Weber, J.Sieper, Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage J.Rheumatol. 26, (1999) 870-879.
- [275] M.Kaiser, J.Haag, S.Soder, B.Bau, T.Aigner, Bone morphogenetic protein and transforming growth factor beta inhibitory Smads 6 and 7 are expressed in human adult normal and osteoarthritic cartilage in vivo and are differentially regulated in vitro by interleukin-1beta Arthritis Rheum. 50, (2004) 3535-3540.
- [276] V.L.De, B.Zheng, T.Fischer, E.Elenko, M.G.Farquhar, The regulator of G protein signaling family Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol. 40, (2000) 235-271.
- [277] C.G.James, C.T.Appleton, V.Ulici, T.M.Underhill, F.Beier, Microarray analyses of gene expression during chondrocyte differentiation identifies novel regulators of hypertrophy Mol.Biol.Cell 16, (2005) 5316-5333.
- [278] C.T.Appleton, C.G.James, F.Beier, Regulator of G-protein signaling (RGS) proteins differentially control chondrocyte differentiation J.Cell Physiol 207, (2006) 735-745.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	antisense
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
cDNA	copy DNA
ChIP	Chromatinimmunpräzipitation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco`s modified eagle medium
ds	Doppelstrang
ECM	Extrazelluläre Matrix
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay
et al.	et alii
FKS	fötales Kälberserum
h	Stunden
HMSC	humane mesenchymale Stammzellen
IgG	Immunglobulin G
ITGA10	Integrin alpha10
kb	Kilobasen (-paare)
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MIA	melanoma inhibitory activity
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
NHEM	normale humane epidermale Melanozyten

OA	Osteoarthritis
PAGE	Polyakrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
poly dIdC	Poly-desoxy-Cytosin-desoxy-Inosin
RIPA	radio-immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
S	sense
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunden
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
U	Unit

2. Danksagung

Frau Professor Anja Katrin Bosserhoff möchte ich für die Vergabe des interessanten Themas und für die Betreuung dieser Arbeit danken. Ihre Anleitung, sowie kritische und konstruktive Diskussionsbereitschaft haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Professor Michael Thomm danke ich vielmals für die Bereitschaft, erster Gutachter dieser Dissertation zu sein.

Bei all meinen Kollegen in der Arbeitsgruppe möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und für die nette Laboratmosphäre bedanken.

Ganz herzlich danke ich Jacqueline Schlegel, die mir im Labor zur Seite steht, jederzeit bereitwillig geholfen und geduldig alle Fragen beantwortet hat.

Stephanie Arndt danke ich dafür, dass sie mir beim Korrekturlesen der Arbeit geholfen hat, obwohl sie selbst sehr viel zu tun hatte.

Bei Marion Schuierer möchte ich mich herzlich bedanken, weil sie mir am Anfang der Doktorarbeit im Labor gute Tipps gegeben hat und mit mir gemeinsam versucht, den Arbeitsstress in der Freizeit mit Yoga abzubauen.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie danken, die mich immer unterstützt, an mich glaubt und mir den Rücken stärkt!

3. Erklärung

Hiermit erkläre ich, Ann-Kathrin Wenke, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst und nur die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Diese Arbeit war bisher noch nicht Bestandteil eines Prüfungsverfahrens, andere Promotionsversuche wurden nicht unternommen.

Regensburg, im November 2007

Ann-Kathrin Wenke